

## HOVEDOPPGAVE I FARMAKOLOGI

# Effekter av polyklorerte bifenyler på dopamintransportøren og dopaminreseptorer

av

**Mattis Brønne Wigestrøm**



Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet  
Universitetet i Oslo  
Høsten 2007

---

## **FORORD**

Denne hovedoppgaven i farmakologi er utført ved Institutt for medisinske basalfag, Avdeling for biokjemi. Deler av arbeidet inngår i EU prosjektet, ”ATHON Assessing the Toxicity and Hazard of Non-dioxin-like PCBs Present in Food”. Veiledere var Professor Frode Fonnum, Professor Ivar S. Walaas og Førsteamanuensis Hege Christensen.

Takk til Ingrid S. Andersen for opplæring på laben og mye annen kunnskap. Inger Lise Bogen har også vært viktig. Takk til Kristin Huse Haug, Anne Dreiem og Espen Mariussen.

Ivar S. Walaas kan besvare alle spørsmål om dopamin. Da er det enkelt å være student.

Og aller mest. Takk til Frode Fonnum for god veiledning.

---

# INNHALDSFORTEGNELSE

	Side
FORORD.....	2
FORKORTELSER.....	6
1. INNLEDNING .....	7
1.1 SENTRALNERVESYSTEMET .....	7
1.2 DOPAMIN .....	9
1.2.1 Dopaminreseptorer.....	9
1.2.2 Dopamintransportøren.....	10
1.2.3 ADHD .....	11
1.3 POLYKLORETERTE BIFENYLER.....	11
1.3.1 Toksisitet.....	12
1.4 PROBLEMSTILLINGER.....	13
2. MATERIALER OG METODER .....	15
2.1 DYR.....	15
2.2 KJEMIKALIER.....	15
2.3 TEORIEN BAK RADIOLIGANDFORSØK .....	16
2.4 EFFEKT AV PCB PÅ DAT-BINDING <i>IN VITRO</i> .....	16
2.4.1 Metodeutvikling.....	16
2.4.2 Isolering av synaptosomer.....	17
2.4.4 Måling av PCB effekt på DAT-binding.....	18
2.5 EFFEKT AV PCB-EKSPONERING UNDER HJERNENS UTVIKLING PÅ DAT OG D <sub>1</sub> /D <sub>5</sub> -RESEPTORBINDING .....	18
2.5.1 Atferdsstudie etter PCB-eksponering under hjernens utvikling.....	18
2.5.2 Innledende metodeforsøk.....	19
2.5.3 Isolering av homogenat.....	19
2.5.4 Måling av D <sub>1</sub> /D <sub>5</sub> -reseptorbinding .....	20
2.6 PROTEINMÅLING .....	20
2.7 STATISTIKK .....	20
3. RESULTATER.....	21
3.1 EFFEKT AV PCB PÅ DAT-BINDING <i>IN VITRO</i> .....	21

---

3.1.1 Metodeutvikling.....	21
3.1.2 Effekt av PCB på DAT-binding.....	26
3.1.3 Struktur aktivitet.....	32
3.2 EFFEKT AV PCB-EKSPONERING UNDER HJERNENS UTVIKLING PÅ DAT OG D <sub>1</sub> /D <sub>5</sub> -RESEPTORBINDING.....	35
3.2.1 Atferdsstudie etter PCB-eksponering under hjernens utvikling.....	35
3.2.2 Innledende metodeforsøk.....	36
3.2.3 D <sub>1</sub> /D <sub>5</sub> -reseptorbinding.....	37
3.2.4 DAT-binding.....	39
4. DISKUSJON.....	42
4.1 UTVIKLING AV METODE FOR MÅLING AV DAT-BINDING .....	42
4.2 EFFEKT AV PCB PÅ DAT-BINDING <i>IN VITRO</i> .....	44
4.3 EFFEKT AV PCB-EKSPONERING UNDER HJERNENS UTVIKLING PÅ DAT OG D <sub>1</sub> /D <sub>5</sub> -RESEPTORBINDING.....	49
4.4 OPPSUMMERING.....	51
4.5 FORSLAG TIL VIDERE ARBEID .....	51

## APPENDIKS

- I. Bufferløsninger
- II. Pipetteringsskjema

---

## SAMMENDRAG

Polyklorerte bifenyler (PCB) er en gruppe klorerte aromatiske hydrokarboner. Tidligere studier har vist at PCB-eksponering kan gi hyperaktivitet, og problemer med læring og hukommelse. De kognitive effektene er foreslått å henge sammen med et endret dopaminnivå i hjernen etter PCB-eksponering, men mekanismen er ukjent. Jeg har utviklet en metode for måling av binding til dopamintransportøren DAT, og vist at PCB hemmer binding til DAT. I oppgaven er 20 PCB-kongenerer med ulik struktur og særegne fysikalsk-kjemiske egenskaper kartlagt, og det er påvist hvilke egenskaper som kan forklare deres evne til å hemme DAT-binding. Det har også blitt undersøkt om PCB-eksponering under hjernens utvikling endrer DAT eller D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptornivå i rottehjernen.

---

## **FORKORTELSER**

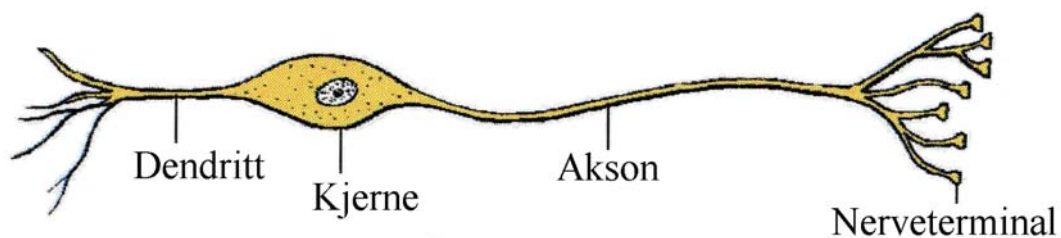
5-HT	Serotonin
ADHD	Hyperkinetiske forstyrrelser, "Attention-Deficit Hyperactivity Disorder"
AHr	Aryl-hydrokarbon reseptor
ATP	Adenosintrifosfat
BCA	"Bicinchoninic acid"
BSA	Bovin Serum Albumin
cAMP	Syklisk adenosinmonofosfat
CNS	Sentralnervesystemet
COMT	Katekol-O-metyltransferase
CPMA	Telling per minutt
CYP	Cytokrom P450
D1	Dopaminreseptortype D1
D5	Dopaminreseptortype D5
DARPP-32	Dopamin- og cAMP regulert fosfoprotein med molekylvekt 32,000 Dalton
DAT	Dopamintransportøren
DOPAC	3,4-dihydroksyfenyleddiksyre
GABA	$\gamma$ -aminosmørsyre
HVA	Homovanillin syre
L-DOPA	3,4-dihydroksyfenylalanin
MAO	Monoamin oksidase
mRNA	Budbringer ribonukleinsyre
NET	Noradrenalintransportøren
PCB	Polyklorete bifenyler
RPM	Omdreining per minutt
SEM	Standardfeil av gjennomsnitt
UNEP	United Nations Environment Programme
VMAT	Vesikulær monoamin transportør 2
WKY	Wistar-Kyoto

# 1. INNLEDNING

## 1.1 Sentralnervesystemet

Nervecellen er hjernens funksjonelle grunnelement. Fra nervecellens kropp sendes to typer utløpere: dendritter og aksoner. De fleste nevroner har mange dendritter, men nesten alltid bare ett akson. Både dendrittene og aksonet forgrener seg i varierende grad. I enden av aksonet finner vi nerveterminalen. Figur 1.1 viser en typisk illustrasjon av et nevron.

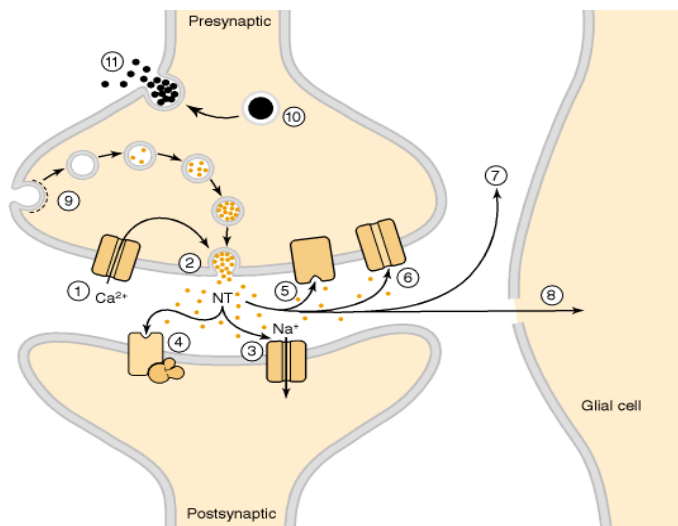
Fremstillingen stammer fra 1800- og 1900-tallet. Nerveceller er ekstremt polymorfe og mange ser annerledes ut enn figur 1.1.



Figur 1.1 Skematisk fremstilling av en nervecelle (Sand et al., 2001).

Nevroner har evne til å reagere på stimuli med elektrisk utladning. Dette er en viktig forutsetning for kommunikasjon mellom nerveceller. Den elektriske utladningen, aksjonspotensialet, dannes av en flyktig ionestrøm gjennom cellemembranen. Aksjonspotensialet ledes langs aksonet. En forenkling av hendelsene idet aksjonspotensialet når nerveterminalen er vist i figur 1.2.

Nerveceller kommuniserer hovedsakelig gjennom kjemiske synapser, mens direkte elektrisk kobling er sjelden. Den presynaptiske cellen frigir et kjemisk signal i form av en neurotransmitter. Transmitteren diffunderer over synapsespalten og binder postsynaptiske reseptorer. Disse er knyttet direkte eller indirekte til ionekanaler, og hvorvidt kanalene er åpne eller lukket påvirkes av transmitterens reseptorbinding. Åpning av visse ionekanaler depolariserer cellemembranen, og med tilstrekkelig depolarisering sendes et aksjonspotensiale fra aksonhalsen til nerveterminalen. På denne måten fører nevroner informasjon fra og til hverandre. Sammen danner de et komplisert, men ordnet nettverk av flere milliarder nerveceller.



Figur 1.2 Aksjonspotensialet aktiverer spenningsstyrte  $\text{Ca}^{2+}$ -kanaler (1). Innstrømning av  $\text{Ca}^{2+}$  utløser eksocytose av små synaptiske vesikler og neurotransmitter frisetting (2). Neurotransmitterne reagerer med pre- eller postsynaptiske reseptorer, som kan være ionotrope (3) eller metabotrope (4,5). Neurotransmitteren fjernes fra synapsespalten ved reopptak (6), diffusjon (7) og enzymatisk nedbrytning (7). Enkelte neurotransmittere tas opp, og metaboliseres i glia celler (8). Membranen i de synaptiske vesiklene resirkuleres ved endocytose (9). Neuropeptider og proteiner lagres i "large dense core granules" (LDCG) (10). Innholdet i LDCG slippes fri etter repetert stimulering (11). (Siegel et al., 1999).

Transmittere i nerveterminalen er lagret i vesikler (figur 1.2) og klassifiseres i tre grupper: klassiske transmittere som acetylcholin, glutamat, glysin og GABA, monoaminene dopamin, noradrenalin, adrenalin og serotonin, og neuropeptidene. Den kvantitativt viktigste eksitatoriske neurotransmitteren i hjernen er glutamat (Fonnum, 1984), mens den viktigste inhibitoriske transmitteren er GABA (Krnjevic, 1970). Glutamat og GABA virker lynraskt og bringer presis informasjon i form av et eksitatorisk eller et inhibitorisk signal. Andre transmittere er modulerende i sin effekt og aktive bare i spesifikke deler av hjernen. Dopamin er en slik modulerende transmitter.

For at signalet kan avsluttes og synapsen nullstilles, er det avgjørende at transmitteren fjernes etter reseptoraktivering. Diffusjon er viktig de første millisekundene etter frigjøring av neurotransmitter. Acetylcholin degraderes av ekstracellulære enzymer, men de fleste neurotransmittere fjernes av opptak i nevroner og gliaceller (Brodal, 2004; Masson et al., 1999).



---

## 1.2 Dopamin

Første trinn i dopaminsyntesen er omdanning av tyrosin til 3,4-dihydroksyfenylalanin (L-DOPA). Trinnet er hastighetsbegrensende og tyrosinhydroksylase katalyserer reaksjonen. Tyrosinhydroksylase reguleres av negativ tilbakekobling fra katekolaminer (Alousi and Weiner, 1966). Tyrosin og oksygen er substrat for tyrosinhydroksylase, mens biopterin fungerer som kofaktor (Shiman et al., 1971). Neste trinn i syntesen er omdanning av L-DOPA til dopamin ved hjelp av enzymet aromatisk aminosyre-dekarboksylase. Dette enzymet er ikke spesifikt for L-DOPA, men dekarboksylerer flere aromatiske aminosyrer. De nevnte syntesetrinn skjer i cytosol, men vesikulær monoamintransportør 2 (VMAT2) transporterer dopamin inn i synaptiske vesikler. Opptaket er avhengig av adenosin 5'-trifosfat (ATP) og er koblet til en protonpumpe. VMAT2 er lite spesifikk og transporterer endogene biogene aminer, så vel som amfetamin. Dopamin frisettes i synapsen ved eksocytose, men kan forflyttes tilbake i nervecellen av dopamintransportøren (DAT). Inne i vesiklene er dopamin beskyttet mot enzymatisk nedbrytning, men i cytosol brytes dopamin ned av monoaminoksidase (MAO) enzymer til 3,4-dihydroksyfenyledikksyre (DOPAC). Enzymet katekol-O-metyltransferase (COMT) katalyserer omdanningen av DOPAC til homovanillinsyre (HVA).

Bare ganske få nerveceller bruker dopamin som transmitter (Hököfelt et al., 1976), men med tallrike dopaminerge, aksonale forgreninger innnerverer de det meste av hjernen. Ett enkelt dopaminergt akson kan faktisk forgrene seg så kraftig at det ender i flere hundretusen nerveterminaler. Dersom vi ser bort fra prolaktinhemmende dopaminceller i hypothalamus, kan vi plassere dopaminerge nevroner i tre hovedbaner. Fra midthjernen innnerveres: (1) dorsalstriatum, (2) ventralstriatum med nucleus accumbens og (3) prefrontalkorteks. Den første nigrostriatale banen strekker seg fra cellekropper i substantia nigra, og er involvert i kontroll av frivillige bevegelser (Ungerstedt, 1976). Den andre har utspring i ventrale-tegmentum, og kalles den mesolimbiske banen. Det er foreslått at denne banen medierer viktigheten av ytre hendelser (Kapur, 2004). Den siste mesokortikale banen er involvert i modulering av arbeidshukommelse (Sawaguchi and Goldman-Rakic, 1991).

### 1.2.1 Dopaminreseptorer

Dopaminreseptorene deles inn i to grupper: D<sub>1</sub>-like reseptorer (D<sub>1</sub> og D<sub>5</sub>) og D<sub>2</sub>-like reseptorer (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> og D<sub>4</sub>). Begge gruppene er koblet til G-protein. D<sub>1</sub>-gruppen stimulerer

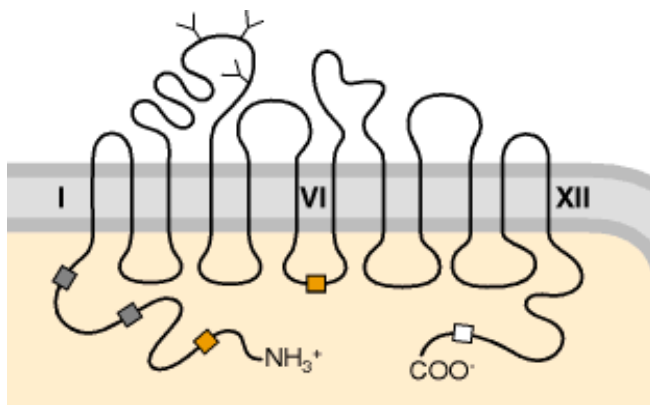
---

dannelsen av adenosin 3',5'-monofosfat (cAMP), mens D<sub>2</sub>-gruppen har motsatt effekt (Missale et al., 1998). Arbeidet til Greengard (2001) økte kunnskapen om signalveiene videre. Dannelse av cAMP aktiverer en proteinkinase som fosforylerer dopamin- og cAMP-regulert fosfoprotein-32 (DARPP-32), og hemmer fosfatase 1. DARPP-32 har en nøkkelrolle som dopaminmediator. D<sub>1</sub>-like reseptorer finner vi først og fremst postsynaptisk, mens D<sub>2</sub>-like reseptorer er plassert både pre- og postsynaptisk (Meador-Woodruff et al., 1989; Moine and Bloch, 1995). Mange dopamin-reseptorer er også plassert utenfor synapsen (Sesack et al., 1994; Yung et al., 1995). Hittil har det ikke vært mulig å differensiere subtypene D<sub>1</sub> og D<sub>5</sub> farmakologisk, men dopamin har ca 10 ganger høyere affinitet for D<sub>5</sub>- enn for D<sub>1</sub>-reseptoren (Missale et al., 1998). D<sub>1</sub>-reseptor mRNA uttrykkes i områder med dopaminerg innervering (Weiner et al., 1991). D<sub>5</sub>-reseptoren uttrykkes i lavere antall og mRNA begrenses til hippocampus, substantia nigra og laterale mammelære kjerner (Tiberi et al., 1991).

### **1.2.2 Dopamintransportøren**

Dopamintransportøren sitter i cellemembranen og forflytter ekstracellulær dopamin tilbake til nervecellen. DAT er plassert på cellekropper, dendritter og aksoner, men tilsynelatende utenfor de aktive sonene i synapsen (Hersch et al., 1997; Nirenberg et al., 1996). Diffusjon er viktigere enn dopaminopptak for reduksjon av synaptisk dopaminkonsentrasjon. Dopamins rekkevidde og levetid utenfor synapsen begrenses av DAT (Cragg and Rice, 2004), men et typisk trekk ved dopaminsignalisering er at den ikke er avgrenset til lukkede synapser. I rottehjernen har DAT fysiologisk levetid på to-tre dager, men dopamintransportøren er også dynamisk regulert (Gulley and Zahniser, 2003). DAT transporterer dopamin ved en Na<sup>+</sup> og Cl<sup>-</sup>-transport koblet mekanisme. Transport av dopamin avhenger derfor av Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen, og forbindelser som bremser Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase hemmer også dopaminopptak.

At DAT begrenser dopaminsignalisering, tydeliggjøres av forbindelser som hemmer dens funksjon. Forbindelsene er av to hovedtyper. Den første typen konkurrerer med dopamin om opptak, men kan i tillegg indusere dopaminlekkasje ut av cellen via DAT. Amfetamin virker på denne måten (Fischer and Cho, 1979; Kahlig and Galli, 2003). Den andre typen DAT-hemmere er rene opptakshemmere, og ikke DAT substrater. Kokain tilhører denne gruppen. Begge typer forbindelser gir rask forsterkning av dopaminerg signalisering.



Figur 1.3 Dopamintransportøren har 12 transmembrane domener. N- og C-terminal ende ligger intracellulært. Løkken mellom tredje og fjerde transmembrane segment er ekstra lang og kan glykosyleres. Glykosyleringen regulerer DAT trafikk og stabilitet (Siegel et al., 1999).

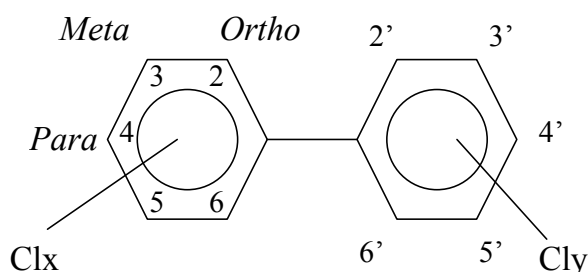
### 1.2.3 ADHD

Hyperkinetiske forstyrrelser (ADHD) kjennetegnes av symptomene hyperaktivitet, økt impulsivitet og nedsatt oppmerksomhetsevne. ADHD har høy arvelighet (Biederman and Faraone, 2002) og genene som er involvert koder stort sett for komponenter i katekolaminsystemene. Dette inkluderer DAT, serotonintransportøren, D<sub>4</sub>- og D<sub>5</sub>-reseptor og dopamin β-hydroksylase (Faraone and Khan, 2006). DAT er også hovedmål for de mest brukte legemidlene mot ADHD: metylfenidat og amfetamin, som virker ved å øke det ekstracellulære dopaminnivået. Disse legemidlenes effekt antyder nedsatt dopamintransmisjon hos personer med diagnosen. Det er interessant at den kliniske effekten av metylfenidat inntreffer raskt, i motsetning til antidepressive monoaminerge reopptakshemmere som trenger uker før effekt. Enkelte studier har observert økt DAT-ekspresjon hos ADHD pasienter (Dougherty et al., 1999; Dresel et al., 2000), som igjen kan være en adaptiv kompensasjon for endret dopaminsignalisering.

### 1.3 Polyklorerte bifenyler

Polyklorerte bifenyler (PCB) er en gruppe klorerte aromatiske hydrokarboner utviklet på 1920-tallet. Flere enestående egenskapene gjorde dem nyttige som isolasjonsmiddel, kjølemateriale, smøremiddel, trykksverte og som tilsetning i lim og maling. Stoffgruppen har god kjøle- og isolasjonsevne, lav brennbarhet og lang holdbarhet. PCB-gruppen består av kongenerer med samme bifenylskjelett (figur 1.4). Antall kloratomer og deres plassering gir 209 mulige kongenerer. Klorplasseringen deler kongenerene i tre grupper: nonortho-, monoortho- og ortho-klorsubstituerte. Nonortho- og monoortho-klorerte kongenerer kan

innta en plan konfigurasjon og kalles dioksin-liknende, mens *ortho*-klorsubstituerte er hindret sterisk i å innta plan konfigurasjon. PCB ble produsert som kongenerblandinger under handelsnavnet Aroclor. Foran handelsnavnet hadde produktene en 4 sifret kode, der de siste to sifrene anga vektprosent klor.



Figur 1.4 Strukturformel for PCB

På 1960-tallet ble PCB påvist i dyr og menneskers fettvev fra hele verden (Jensen, 1966). Stoffgruppen hadde på dette tidspunkt blitt brukt i bare 40 år. PCB er svært stabile forbindelser og motstandsdyktige mot biologisk nedbryting. Dette gir dem et skremmende potensial som miljøgift. PCB akkumuleres i fettvev og dermed oppover næringskjeden, og har forurenset økosystemer over hele verden. Vårt PCB-inntak stammer hovedsakelig fra matvarer som kjøtt, fisk og melkeprodukter (La Rocca and Mantovani, 2006), men kan også overføres til foster via placenta og morsmelk (Bush et al., 1984). Mot slutten av 1970-tallet ble bruken av PCB forbudt i Norge og i de fleste andre industriland. Stockholm-konvensjonen er en global avtale under FNs miljøprogram (UNEP), og har som mål å beskytte mot påvirkning av persistente organiske miljøgifter. Forhandlingene startet i 1998 og over hundre land har siden undertegnet avtalen. Avtalen inneholder forpliktelser vedrørende import, produksjon, bruk, utslipp og avfallsbehandling av blant annet PCB. Tiltakene ser ut til å ha gitt resultater med en rapportert nedgang av PCB i miljøet de senere år (Gomara et al., 2005).

### 1.3.1 Toksisitet

PCB-kongenerene har ulike fysiske, kjemiske og toksikologiske egenskaper. Det har blitt fokusert på giftigheten av non*ortho*substituerte PCBer. Disse er rapportert å kunne gi reproduktive, endokrine og immunologiske forstyrrelser, i tillegg til leverskade, induksjon av CYP enzymer, samt teratogenese og karsinogenese (Safe, 1990). Senere havnet andre toksiske effekter i søkelyset. To ulykker ga mistanke om at PCB kunne skade nervesystemet. I 1968 ble mennesker i Japan forgiftet av risolje kontaminert med termisk degradert PCB, og året

---

etter skjedde det samme i Taiwan. Totalt ble flere tusen mennesker rammet (Hsu et al., 1985; Kuratsune et al., 1971). I tillegg til skadene beskrevet ovenfor, viste ofrene tegn på nevrologiske skader, og barn eksponert prenatalt eller ved amming viste også symptomer (Rogan et al., 1988).

Ulykkene i Asia viste konsekvenser av en akutt forgiftning med høyere PCB dose enn vi normalt eksponeres for. Senere ble epidemiologiske studier utført for å kartlegge virkningen av jevn og lav eksponering. Fisk fra de store amerikanske sjøer inneholder PCB og barn av fiskespisende mødre i Michigan og North Carolina ble derfor studert. (Fein et al., 1984; Gladen et al., 1988; Jacobson and Jacobson, 1996; Rogan et al., 1986). Det ble funnet en korrelasjon mellom grad av PCB-eksponering under utvikling, og dårlig resultat i atferds- og finmotorikktester (Tilson et al., 1990). Det bør nevnes at den forurensede fisken, og risoljen involvert i de asiatiske ulykkene, inneholdt flere andre giftstoffer enn PCB (Seegal, 1996). Sammen med epidemiologiske studiers generelle begrensninger, gjorde dette det vanskelig å avgjøre betydningen av PCB. Atferdseffekter på dyr har likevel styrket mistanken om PCBs nevrotoksisitet. Pre- og postnatal PCB-eksponering rapporteres å kunne gi ADHD-liknende symptomer (Mariussen and Fonnum, 2006; Tilson et al., 1990), men effektene er ofte små. Skadene har blitt foreslått å skyldes endringer i dopaminsystemet, og studier har vist at PCB kan forstyrre hjernens dopaminnivå. Seegal eksponerte voksne aper for Aroclor 1016 og fant varig nedgang av dopaminnivået i visse hjernedeler (Seegal et al., 1991, 1994). Forandringen av dopaminkonsentrasjon synes å avhenge av om det er voksne dyr eller dyr under utvikling som eksponeres (Seegal, 1994).

## **1.4 Problemstillinger**

PCB forstyrrer hjernens dopaminnivå, men mekanismen er delvis ukjent. Det er tidligere vist at PCB hemmer dopaminopptak gjennom DAT. I denne oppgaven er det undersøkt om PCB påvirker binding til DAT. Oppgaven består av tre deler. (1) Det ble utviklet en metode for måling av radioligandbinding til DAT. Metoden ble optimalisert ved å variere ulike forsøksparametere. (2) PCBs aktivitet på DAT-binding ble kartlagt. Et utvalg på 20 PCB-kongenerer ble testet for sin aktivitet på DAT-binding i rottehjernen *in vitro*. Effekten av PCB-kongenerene ble undersøkt i synaptosomer isolert fra striatum, og i ulike konsentrasjoner i synaptosomer isolert fra cerebrum. (3) Til slutt undersøkte vi deler av

---

dopaminsystemet til PCB-eksponerte rotter fra en tidligere atferdsstudie. DAT-binding i striatum, og D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptorbinding i striatum og hippocampus ble målt.

---

## 2. MATERIALER OG METODER

### 2.1 Dyr

Wistar hannrotter (150 g) ble kjøpt fra Møllegaard i Eiby, Danmark.

WKY hannrotter ble kjøpt fra Harlan i Bicester, England.

### 2.2 Kjemikalier

Kjemikalier	Leverandør
[N-methyl- <sup>3</sup> H]SCH 23390	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Storbritannia)
[N-methyl- <sup>3</sup> H]WIN 35,428	PerkinElmer (Massachusetts, USA)
Filter Count	PerkinElmer (Massachusetts, USA)
Ketanserin tartrate	Tocris Bioscience (Bristol, Storbritannia)
Nomifensin	Sigma-Aldrich Co. (Meriden, USA)
PCB-kongenerer	Patrik Andersson (Umeå Universitet, Sverige)
Polyethylenimine	Sigma-Aldrich Co. (Meriden, USA)
Potassium chloride	Merck (Darmstadt, Tyskland)
SCH 23390 hydrochloride	Tocris Bioscience (Bristol, Storbritannia)
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Sigma-Aldrich Co. (Meriden, USA)
Øvrige kjemikalier ble kjøpt fra kommersielle leverandører	

---

## 2.3 Teorien bak radioligandforsøk

Bindingsstudier bygger på enkle prinsipper. En radioligand inkuberes med sitt målprotein, og ubundet radioaktivitet vaskes vekk. Den resterende radioaktiviteten representerer radioligandens binding, som igjen består av spesifikk binding til målproteinet og uspesifikk binding. Uspesifikk binding er binding til alt annet enn målproteinet. Dette inkluderer binding til andre proteiner, filteret, adsorpsjon til vev og oppløsning i membranlipider (Bylund and Toews, 1993). For å måle den uspesifikke bindingen tilsettes en umerket ligand som binder målproteinet på liknende vis som radioliganden. Denne liganden tilsettes i stort overskudd og hemmer radioligand binding til målproteinet totalt. All resterende radioligandbinding er da uspesifikk.

Spesifikk binding er ingen direkte observerbar størrelse ved måling av radioligandbinding. Vi måler total og uspesifikk binding, og kalkulerer spesifikk binding ved å subtrahere uspesifikk binding fra total binding (ligning 2.1). Vi ønsker høyest mulig prosent spesifikk binding (ligning 2.2).

*Ligning 2.1*      $\text{SPESIFIKK BINDING} = \text{TOTAL BINDING} - \text{USPESIFIKK BINDING}$

*Ligning 2.2*      $\% \text{ SPESIFIKK BINDING} = \frac{(\text{TOTAL BINDING} - \text{USPESIFIKK BINDING}) \times 100}{\text{TOTAL BINDING}}$

Ved å tilsette testforbindelser kan vi måle deres effekt på radioligandbinding til målproteinet. Binding i prøve behandlet med testforbindelse uttrykkes som prosent binding av ubehandlet kontroll (ligning 2.3).

*Ligning 2.3*      $\% \text{ BINDING} = \frac{(\text{BINDING I BEHANDLET PRØVE} - \text{USPESIFIKK BINDING}) \times 100}{\text{BINDING I KONTROLL} - \text{USPESIFIKK BINDING}}$

## 2.4 Effekt av PCB på DAT-binding *in vitro*

### 2.4.1 Metodeutvikling

Prosedyren for måling av DAT-binding ble utviklet med utgangspunkt i en metode brukt av Caudle et al. (2006). Det ble valgt å bruke [<sup>3</sup>H]WIN 35,428 for måling av binding til DAT. Uspesifikk [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-binding ble målt etter tilsetning av nomifensin i høy



---

konsentrasjon. For å optimalisere forsøket varierte vi radioligand- og vevskonsentrasjon, antall skyllinger i vaskeprosedyren og inkuberingstid, enkeltvis. Tilsetning av sukrose i inkuberingsbuffer er tidligere funnet å øke spesifikk [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding (Coffey and Reith, 1994). Vi undersøkte effekten av økende sukrosekonsentrasjon på [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding. For å teste at spesifikk [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding korrelerte med fordeling av dopamin i hjernen, målte vi binding i striatum, cerebrum, cerebellum og hippocampus. I tillegg til synaptosomer ble råhomogenat testet som prøvemateriale.

#### **2.4.2 Isolering av synaptosomer**

Synaptosomer ble isolert etter prinsippene av Gray and Whittaker. (1962), som beskrevet i Mariussen and Fonnum. (2001). Wistar hannrotter (150-200 g) ble sedert med  $\text{CO}_2$  og avlivet ved dekapitering. Hjernen ble lagt på is og deretter homogenisert i 0.32 M sukrose (~5 % w/v, 12 rolige strøk ved 450 rpm i glass-teflon homogenisator). Homogenatet ble sentrifugert ved 1000 g i 10 min (SORVALL SS34 rotor, SORVALL<sup>®</sup> RC-5B Plus, 4 °C), og supernatant blandet med likt volum 1.3 M sukrose til en sluttkonsentrasjon på ~0.8 M sukrose. Blandingen ble sentrifugert ved 21000 g i 30 min (SORVALL SS34 rotor, SORVALL<sup>®</sup> RC-5B Plus, 4 °C) og supernatanten (S2) forsiktig helt av. Pelleten (P2) bestod av to lag. Det øverste hvite laget bestod av synaptosomer og det brune laget under inneholdt hovedsakelig mitokondrier. Begge lagene ble resuspendert sammen i inkuberingsbuffer (19 mM natriumfosfat, 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.32 M sukrose, pH 7.4). Pelleten ble resuspendert i henholdsvis 1.5 ml inkuberingsbuffer/g cerebrum og 5.2 ml inkuberingsbuffer/g striatum. Alt utstyr benyttet ved isolering av synaptosomer ble vasket såpefritt. Synaptosomene ble laget ferske til hvert forsøk, og løsninger og utstyr oppbevart på is. Etter radioligandforsøk ble synaptosomene lagret ved -20 °C for senere proteinmåling.

#### **2.4.3 Måling av DAT-binding**

Reagensrør ble tilsatt 158-170  $\mu\text{l}$  inkuberingsbuffer (19 mM natriumfosfat, 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.32 M sukrose, pH 7.4) og 20  $\mu\text{l}$  synaptosom- eller homogenatsuspensjon. Ved måling av uspesifikk binding ble nomifensin tilsatt til en 10  $\mu\text{M}$  sluttkonsentrasjon. Prøvene inneholdt aldri over 1 % DMSO (v/v) og kontrollene ble tilsatt samme DMSO volum som PCB-prøvene. Videre ble prøvene iblandet [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428 til en 5 nM sluttkonsentrasjon, og et sluttvolum på 200  $\mu\text{l}$ . Etter 2 timers inkubering ble 2 ml iskald vaskeløsning (19 mM natriumfosfat, 125 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4) tilsatt og prøvene vakuumfiltrert gjennom et GF/B filter (Whatman). Prøvene ble umiddelbart skylt 4 ganger til med samme volum

---

skyllebuffer. Filtrene ble overført til tellerør og tilsatt 4 ml Filter Count scintillasjonsvæske. Radioaktivitet ble målt som tellinger per minutt (CPMA) i en Liquid Scintillation Analyzer, Tri-Carb 3100TR. For å begrense uspesifikk binding, ble GF/B filtrene lagt i 0.5 % polyetyleniminløsning 60 minutter før filtrering. Bortsett fra PCB i DMSO ble alle løsninger oppbevart på is under forsøket. Se oppskrift for bufferløsninger og pipetteringsskjema i appendiks.

#### **2.4.4 Måling av PCB effekt på DAT-binding**

Effekten av 20 ulike PCB-kongenerer på DAT-binding i synaptosomer ble undersøkt. I tidligere studier har man sett tap av membranintegritet og løselighetsproblemer ved PCB-konsentrasjoner over 40  $\mu\text{M}$  (Bemis and Seegal, 2004). I forsøk med synaptosomer isolert fra cerebrum ble PCB tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 5, 10, 20 og 40  $\mu\text{M}$ . I forsøk med synaptosomer isolert fra striatum ble PCB tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 10  $\mu\text{M}$ . Ubehandlete kontroller ble målt både på begynnelsen og slutten av hvert forsøk. Kongenerer ble dessuten testet i ulik rekkefølge i forskjellige forsøk.

### **2.5 Effekt av PCB-eksponering under hjernens utvikling på DAT og D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptorbinding**

#### **2.5.1 Atferdsstudie etter PCB-eksponering under hjernens utvikling**

I en pilotstudie ved laboratoriet til professor Terje Sagvolden ved Universitetet i Oslo ble WKY rotter eksponert for PCB. Rottene ble eksponert for 10 mg/kg PCB (Aroclor 1254 i maisolje) 3 ganger mellom postnatal dag 10 og 20. PCB ble gitt til 10 rotter, mens 10 kontrollrotter fikk ren maisolje. En markør på rottene viste om de var blitt eksponert for PCB eller ren maisolje, men rottemoren bet av markøren til 7 rotter. Dette reduserte den PCB-eksponerte gruppen til 5 rotter, og kontrollgruppen til 8 rotter.

Rottene ble senere testet i en visuell diskrimineringsoppgave. To hendler ble presentert, og trykk på korrekt hendel (signalisert ved lys over hendelen) ga tilgang til en belønning i form av en vanddråpe. Trykk på feil hendel fikk ingen konsekvens. Hvilken av hendlene som var korrekt varierte tilfeldig, men var alltid signalisert med lys. Belønning i form av vann ble gitt etter to forskjellige protokoller, der de første forsøkene fungerte som en læringsfase hvor hvert eneste korrekte trykk resulterte i belønning. Senere ble belønning gitt bare ved enkelte

---

korrekte trykk. Andel korrekte trykk ble brukt som et mål på rottens oppmerksomhet overfor lyssignalet. Forsøkene ble utført av Grete Wøien. 6 uker etter siste PCB-eksponering ble rottene fra atferdsstudien avlivet ved dekapitering. DAT-binding i homogenat fra striatum ble målt som beskrevet i kapittel 2.4.3. Binding til D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptor i homogenat fra striatum og hippocampus ble målt som beskrevet i kapittel 2.5.4.

### **2.5.2 Innledende metodeforsøk**

Måling av binding til DAT med [<sup>3</sup>H]WIN 35,428, og til D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptor med [<sup>3</sup>H]SCH 23390 baserte seg på innkjørte metoder i vårt laboratorium. Måling av binding til D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptor ble utført etter prinsipper beskrevet av Kontur et al. (1994) og von Euler. (1991). I forhold til tidligere prosedyrer ble det forsøkt å øke isolert mengde D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptor og DAT. Endringer som kraftigere sentrifugering ved homogenatfremstilling, nedskalering av forsøksvolum og inkubering ved lavere temperatur for fjerning av endogen ligand ble derfor testet. I forsøk ved vårt laboratorium er det tidligere målt høy spesifikk [<sup>3</sup>H]SCH 23390-binding ved 1 og 2 nM [<sup>3</sup>H]SCH 23390. Graden av spesifikk [<sup>3</sup>H]SCH 23390-binding ble undersøkt i homogenat ved begge disse radioligandkonsentrasjoner.

### **2.5.3 Isolering av homogenat**

WKY rotter ble avlivet ved dekapitering. Striatum (dorsal og ventral) og hippocampus ble fryst ned (-20 °C). Hjernedelene ble tint og homogenisert i 15 volum 50 mM Tris-base buffer (450 rpm, 30 sekunder) i glass-teflon homogenisator. Homogenatet ble sentrifugert ved 100000 g i 30 min (Ti80 rotor, Beckman Optima<sup>TM</sup> LE-80K Ultracentrifuge, 4 °C) og supernatanten fjernet. Pelleten ble rehomogenisert i 15 volum 50 mM Tris-base buffer. For å fjerne endogene ligander ble homogenatet inkubert ved 25 °C i 30 min på vannbad, og deretter sentrifugert ved 100000 g i 30 min (Ti80 rotor, Beckman Optima<sup>TM</sup> LE-80K Ultracentrifuge, 4 °C). Supernatanten ble fjernet og pelleten resuspendert i henholdsvis 4 ml 0.32 M sukrose/ g hippocampus eller 10 ml 0.32 M sukrose/g striatum. Proteinmengde ble målt, og fortynnet slik at homogenatene fra striatum hadde samme proteinkonsentrasjon, og slik at homogenatene fra hippocampus hadde samme proteinkonsentrasjon. Homogenatene ble fryst ned (-20 °C). Alt utstyr benyttet ved tilberedning av homogenat ble vasket såpefritt.

---

#### 2.5.4 Måling av D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptorbinding

Reagensrør ble tilsatt 144-152 µl inkuberingsbuffer (50 mM Tris, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4), 100 nM ketanserin og 30 µl hippocampus- eller 20 µl striatum-homogenat. Ketanserin ble tilsatt for å blokkere binding til 5-HT<sub>2</sub>-reseptoren. Ved måling av uspesifikk binding ble umerket SCH 23390 tilsatt til en 1 µM sluttkonsentrasjon. Prøvene ble preinkubert ved 25 °C i 10 min, og tilsatt [<sup>3</sup>H]SCH 23390 til et sluttvolum på 200 µl. Striatum-homogenat ble inkubert med 2 nM [<sup>3</sup>H]SCH 23390, mens hippocampus-homogenat ble inkubert med 1 nM [<sup>3</sup>H]SCH 23390. Etter 30 minutters inkubering ble 5 ml iskald vaskeløsning (50 mM Tris-base, pH 7.4) tilsatt og vakuumfiltrert gjennom et GF/B filter (Whatman). Filtrene med striatum- og hippocampus-homogenat ble umiddelbart skylt henholdsvis 2 og 4 ganger til med samme volum. Filtrene ble overført til tellerør og tilsatt 4 ml Filter Count scintillasjonsvæske. Radioaktivitet ble målt som tellinger per minutt (CPMA) i en Liquid Scintillation Analyzer, Tri-Carb 3100TR. For å begrense uspesifikk binding ble GF/B filtrene lagt i 0.5 % polyetylenimin løsning 60 minutter før filtrering. Se oppskrift for bufferløsninger og pipetteringsskjema i appendiks.

#### 2.6 Proteinmåling

Pierce BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit ble brukt til å måle proteinkonsentrasjon. Metoden bygger på to reaksjoner (Smith et al., 1985): (1) I basisk løsning blir Cu<sup>2+</sup> redusert til Cu<sup>1+</sup> av proteiner. (2) Sammen med to "bicinchoninic acid" (BCA)-molekyler danner Cu<sup>1+</sup> et lillafarget kompleks med absorbans ved 562 nm. Proteinkonsentrasjon i prøvene blir regnet ut ved hjelp av en Bovin Serum Albumin (BSA) standardkurve (0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 og 1.5 mg/ml). 10 µl prøve eller standard ble tilsatt hver brønn i en 96-brønners mikroplate. Prøvene var på forhånd fortynnet til å ligge innenfor konsentrasjonsområdet 0.125-1.5 mg/ml protein. Prøvene og standarder ble tilsatt 200 µl BCA reagens, inkubert i 30 min ved 25 °C og målt ved 562 nm i en Labsystems Multiskan Bichromatic plateleser.

#### 2.7 Statistikk

Data er uttrykt som gjennomsnitt ± standardfeil av gjennomsnitt (SEM). Det var rimelig å anta normalfordeling og lik varians i datasett. Ved sammenlikning av to grupper ble Student's *t*-test brukt. For sammenlikning av tre eller flere grupper ble enveis Anova benyttet, og Dunnett's test ble benyttet ved sammenlikning av grupper mot en fast kontroll. Forskjeller ble ansett som signifikante ved  $p < 0.05$ .

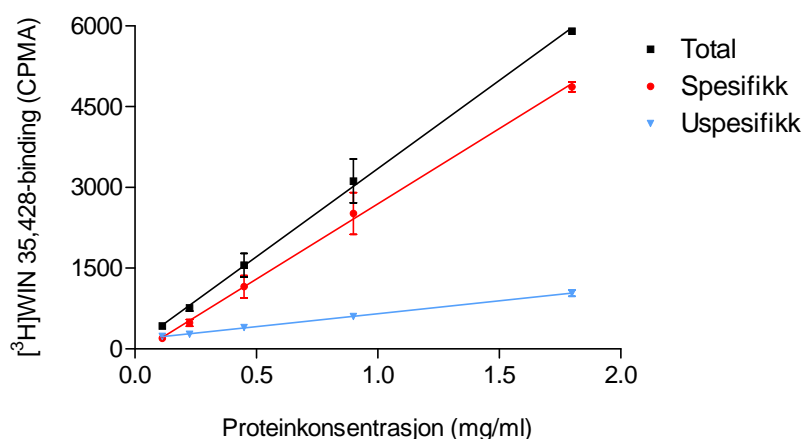
### 3. RESULTATER

#### 3.1 Effekt av PCB på DAT-binding *in vitro*

##### 3.1.1 Metodeutvikling

DAT-binding ble målt med [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428. Et optimalt radioligandforsøk har høy spesifikk og lav uspesifikk binding. Forholdet mellom spesifikk og uspesifikk binding avhenger naturligvis av hvor spesifikk radioliganden er, men forsøksparametere som vevsmengde, radioligandkonsentrasjon, og antall skyllinger i vaskeprosedyren er også viktige.

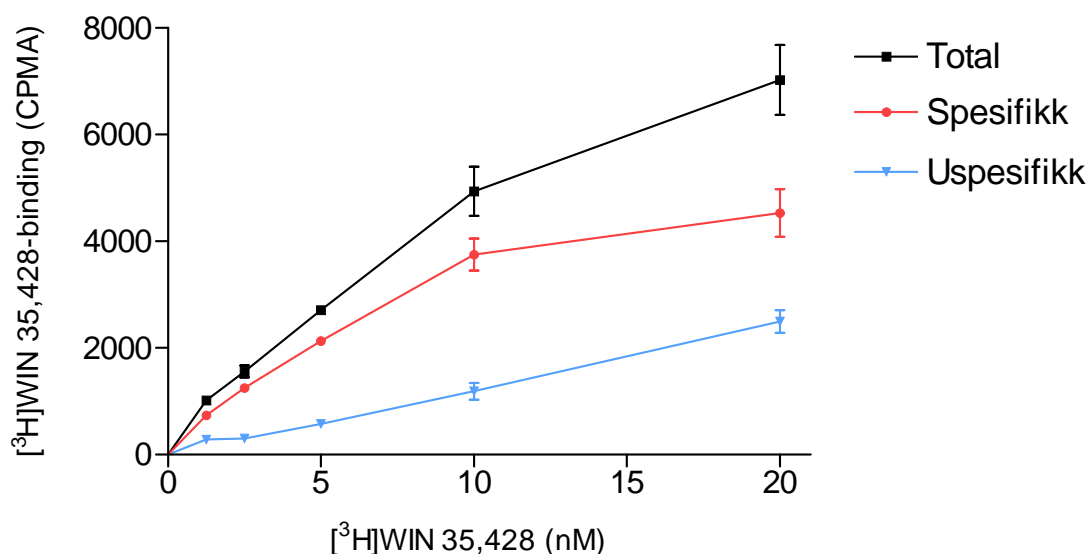
Figur 3.1 viser forholdet mellom vevsmengde (mg/ml protein) og binding av [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428. Total binding steg proporsjonalt med økende mengde vev. Uspesifikk binding bestod hovedsakelig av filterbinding og økte mindre enn total binding. Spesifikk binding økte derfor proporsjonalt med økende vevsmengde. For måling av [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding i synaptosomer isolert fra cerebrum ble 0.9 mg/ml protein valgt som proteinkonsentrasjon. Denne proteinkonsentrasjon ga høy spesifikk og lav uspesifikk binding. Striatum har høyere DAT tetthet enn cerebrum. For måling av [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding i synaptosomer isolert fra striatum ble 0.25 mg/ml protein valgt som proteinkonsentrasjon.



Figur 3.1 [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding ved økende proteinkonsentrasjon. Hvert punkt viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre forsøk utført i triplikat eller duplikat. Synaptosomer og 5 nM [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C i 120 min. Reaksjonen ble avsluttet med 5x2 ml skylling.

Figur 3.2 viser forholdet mellom [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-konsentrasjon og [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding. Total binding økte raskere enn uspesifikk binding med økende [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-

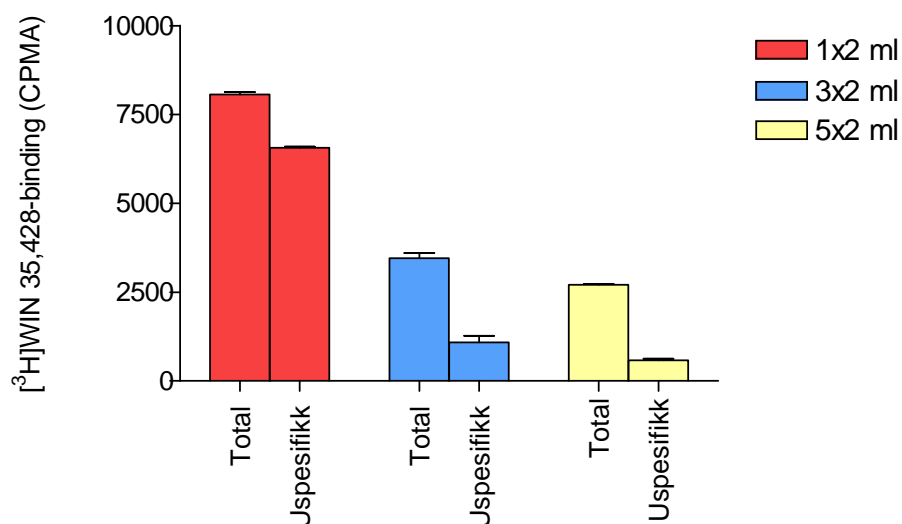
konsentrasjon, men ved [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-konsentrasjoner over 10 nM steg total og uspesifikk binding tilnærmet parallelt. At avstanden mellom total og uspesifikk binding var konstant betydde at den spesifikke bindingen hadde flatet ut og lot seg mette. Det var en viktig indikasjon på at vi hadde en fungerende metode. Uspesifikk binding vokste derimot lineært og lot seg ikke mette. Ved 5 nM [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428 ble det målt høy spesifikk og lav uspesifikk binding. For måling av [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding i synaptosomer ble 5 nM [ $^3\text{H}$ ]WIN35,428 valgt som radioligandkonsentrasjon.



Figur

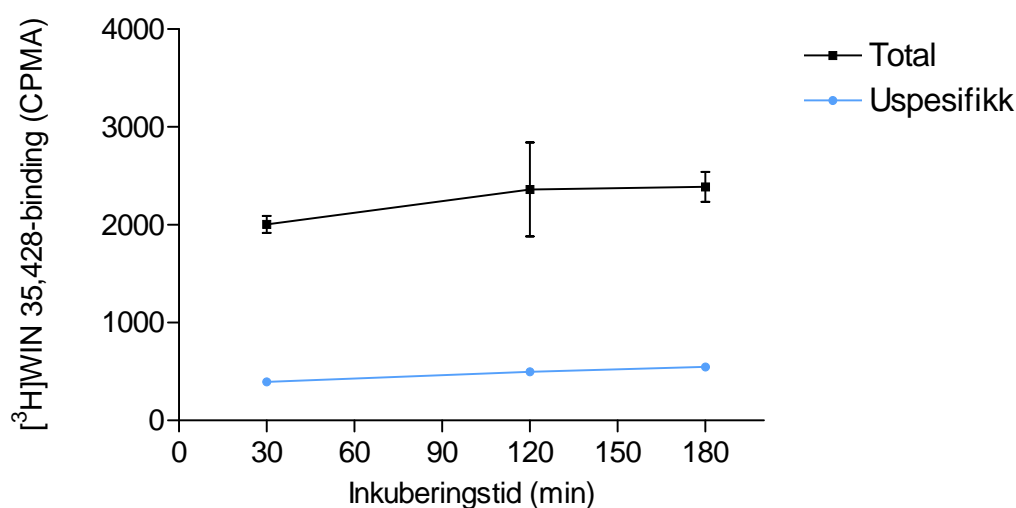
3.2 [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding ved økende [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-konsentrasjoner. Hvert punkt viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av to forsøk utført i duplikat. Synaptosomer isolert fra cerebrum (0.9 mg/ml protein) ble inkubert ved 4 °C i 120 min. Reaksjonen ble avsluttet med 5x2 ml skylling.

Figur 3.3 viser total og uspesifikk binding etter ulike vaskeprosedyrer. Uspesifikk binding ble redusert ved å øke antall skyllinger. Spesifikk binding var like høy etter at filteret var blitt skylt tre og fem ganger, men fem skyllinger ga lavere uspesifikk binding. Det ble derfor valgt å skylle fem ganger med 2 ml. Effekten av ulike skyllevolum på total og uspesifikk binding ble målt, men volumet hadde liten betydning.



Figur 3.3 [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding etter økende antall skyllinger av filter. Hver stolpe viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av to forsøk utført i duplikat. Synaptosomer (0.9 mg/ml protein) og 5 nM [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C i 120 min.

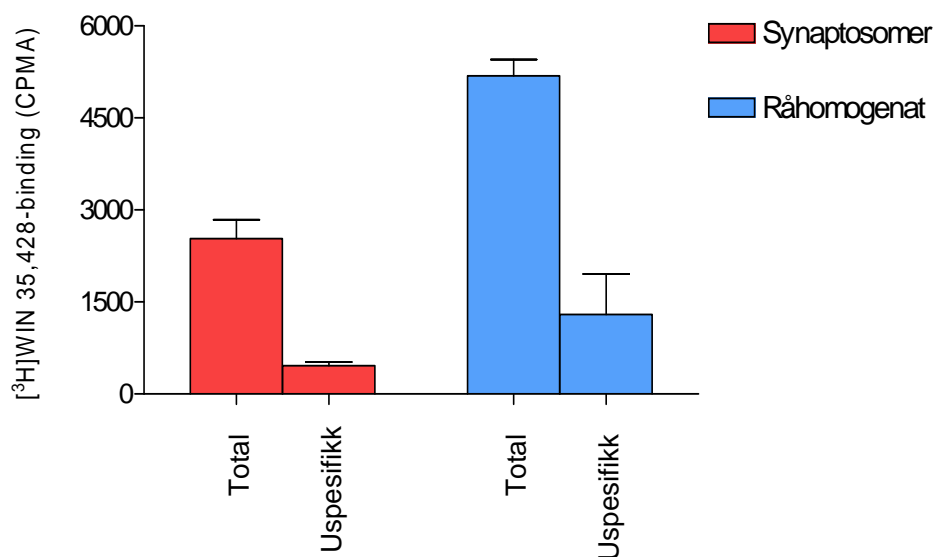
[ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428 binding ble målt etter ulike inkuberingstider. Binding av [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428 var tilnærmet konstant mellom 30 og 180 minutters inkubering (figur 3.4). Det ble valgt å inkubere [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428 i 120 minutter.



Figur 3.4 [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding ved økende inkuberingstid. Hvert punkt viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av to forsøk utført i duplikat. Synaptosomer (0.9 mg/ml protein) og 5 nM [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C. Reaksjonen ble avsluttet med 5x2 ml skylling.

Det ble målt høyere spesifikk binding per mg våtvekt hjerne i råhomogenat enn i synaptosomer. Dette kan skyldes at DAT-protein går tapt under sentrifugering av

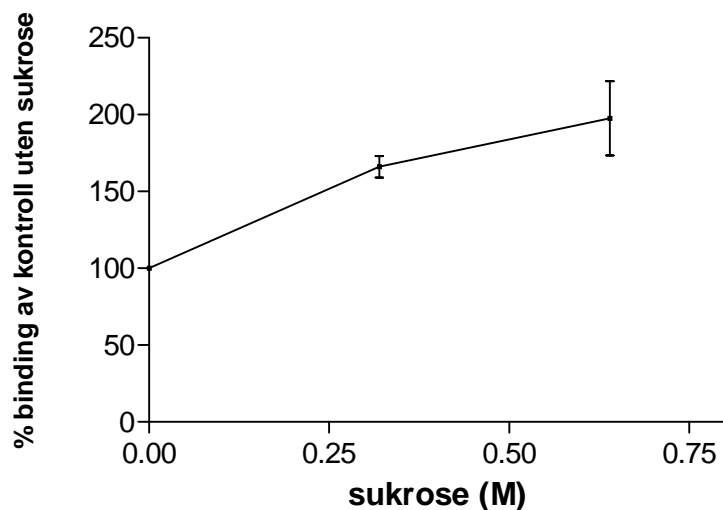
synaptosomer. Et synaptosom er en avsnøret nerveterminal fremstilt ved homogenisering, og oppkonsentrert av sentrifugering. Bruk av synaptosomer garanterer vev fra nerveceller. Råhomogenat består av nerveceller, men også av komponenter som myelin som kan være uheldig i bindingsstudier med PCB. Det ble derfor valgt å måle [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding i synaptosomer.



Figur 3.5 [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding i synaptosomer og i råhomogenat. Synaptosom- og homogenatprøvene inneholdt henholdsvis 13 og 5 mg våtvekt cerebrum. Hver stolpe viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av to forsøk utført i duplikat. Prøvene ble inkubert ved 4 °C i 120 min med 5 nM [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428. Reaksjonen ble avsluttet med 5x2 ml skylling.

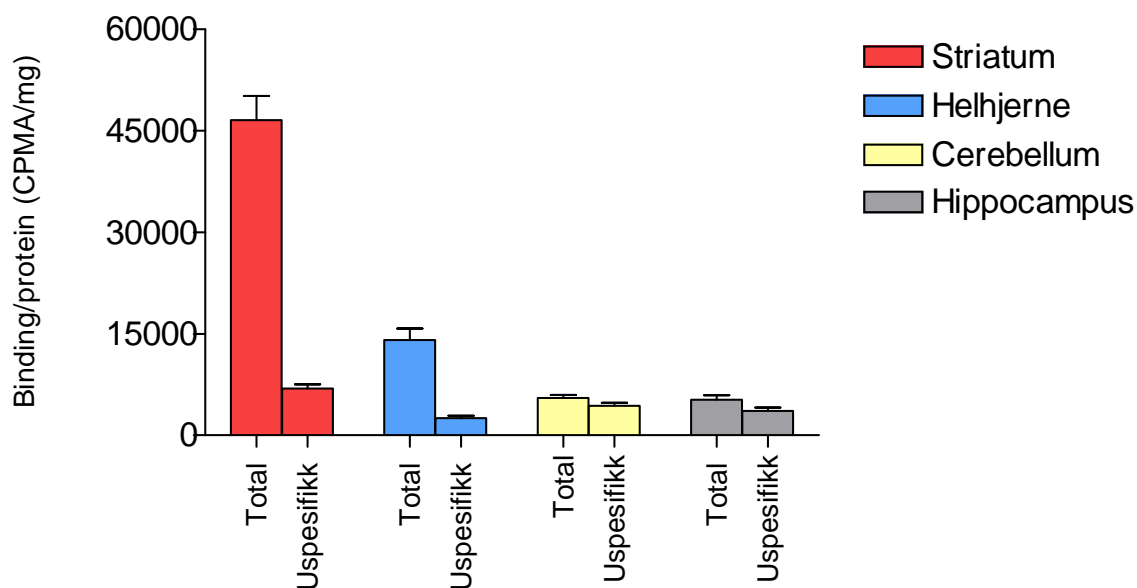
Figur 3.6 viser at spesifikk [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding økte med økende konsentrasjon av sukrose i inkuberingsbuffer. Funnet er i samsvar med tidligere studier, men mekanismen er ukjent (Coffey and Reith, 1994). Det ble valgt å bruke 0.32 M sukrose i inkuberingsbufferen.





Figur 3.6 [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding med økende sukrosekonsentrasjon i inkuberingsbuffer. Hvert punkt viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av to forsøk utført i triplikat. Inkuberingsbufferen inneholdt 19 mM natriumfosfat, 125 mM NaCl, 5mM KCl og eventuelt sukrose. Synaptosomer (0.9 mg/ml protein) og 5 nM [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C i 120 min. Reaksjonen ble avsluttet med 5x2 ml skylling.

[ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding i synaptosomer isolert fra cerebrum, striatum, cerebellum og hippocampus samsvarte godt med hjernedelenes respektive dopamininnhold (figur 3.7) (Dahlin et al., 2007; Moore and Bloom, 1978). Det ble målt høyere spesifikk binding i striatumprøver per mg protein sammenliknet med cerebrumprøver, men en rotte inneholder gjennomsnittlig 1,5 g cerebrum og 0.1 g striatum. Høyest spesifikk binding kan derfor utvinnes fra én rotte ved å benytte vev fra cerebrum. Ulike PCB konsentrasjoners effekt på [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding ble målt i synaptosomer isolert fra cerebrum.



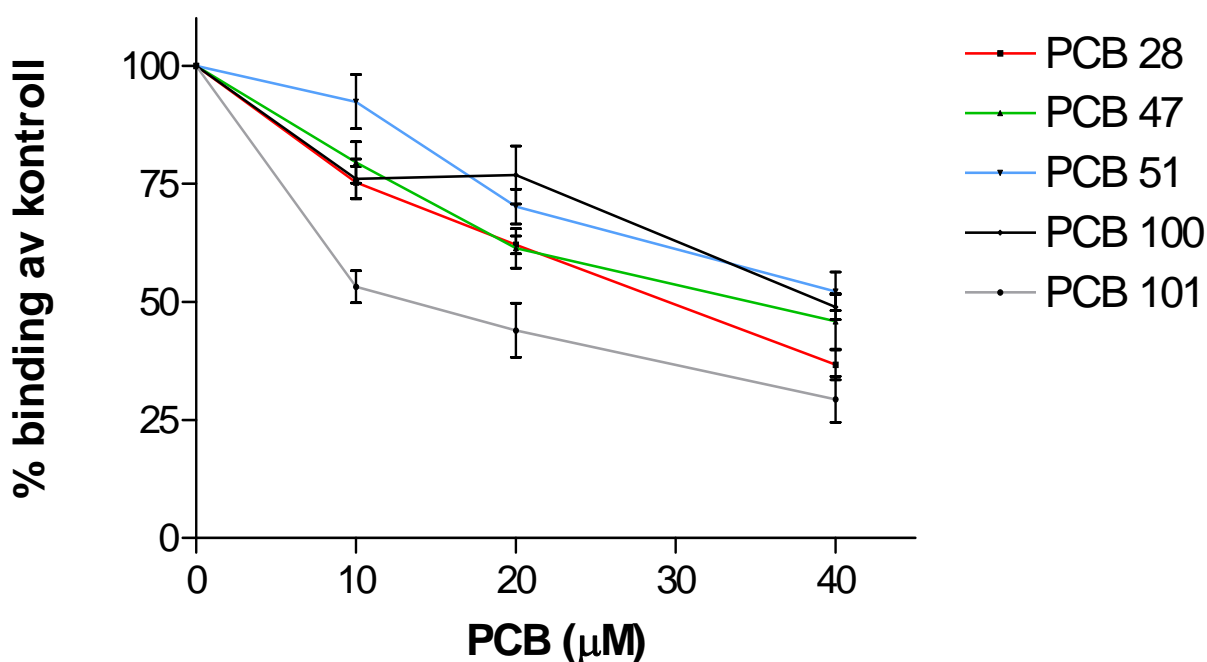
F

Figur 3.7 [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding i synaptosomer isolert fra striatum, cerebrum og cerebellum, eller i homogenat fra hippocampus. Hver stolpe viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av to eller tre forsøk utført i duplikat eller triplikat. Prøvene ble inkubert ved  $4^\circ\text{C}$  i 120 min med 5 nM [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428. Reaksjonen ble avsluttet med 5x2 ml skylling. Proteinkonsentrasjon i striatum, cerebrum, cerebellum og hippocampus: 0.25 mg/ml, 0.9 mg/ml, 0.4 mg/ml og 1.2 mg/ml.

### 3.1.2 Effekt av PCB på DAT-binding

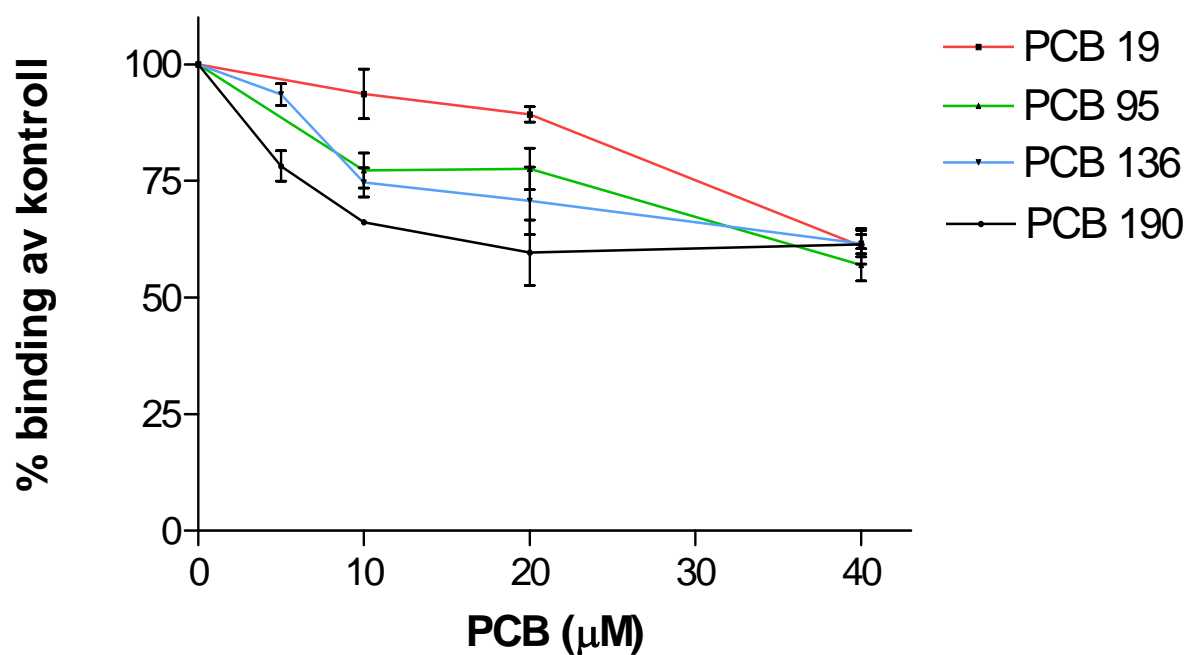
Effekten av 20 ulike PCB kongenerer på DAT-binding ble testet. Binding i prøver tilsatt PCB ble omregnet til prosent binding av ubehandlet kontroll, som beskrevet i kapittel 2.3.

PCB-kongenerene hemmet DAT-binding i ulik grad. PCB 28, 47, 51, 100 og 101 viste større hemming av binding til DAT enn andre kongenerer i synaptosomer fra cerebrum. 40  $\mu\text{M}$  av disse PCBene hemmet DAT-binding med 50-75 % (figur 3.8). De sterkeste hemmerne av DAT-binding viste større hemming av DAT-binding ved 40  $\mu\text{M}$  PCB enn ved 10  $\mu\text{M}$  PCB (enveis Anova, Tukeys test,  $p < 0.05$ ). PCB er en svært fettløselig stoffgruppe og forventes å felle ut ved høye konsentrasjoner. Det er derfor lite hensikt i å lete etter en klassisk sigmoidal hemmingskurve. Siden bare tre ulike PCB konsentrasjoner ble undersøkt, kunne heller ikke den konsentrasjon som forårsaket 50 % hemming av DAT-binding ( $\text{IC}_{50}$ ) beregnes.

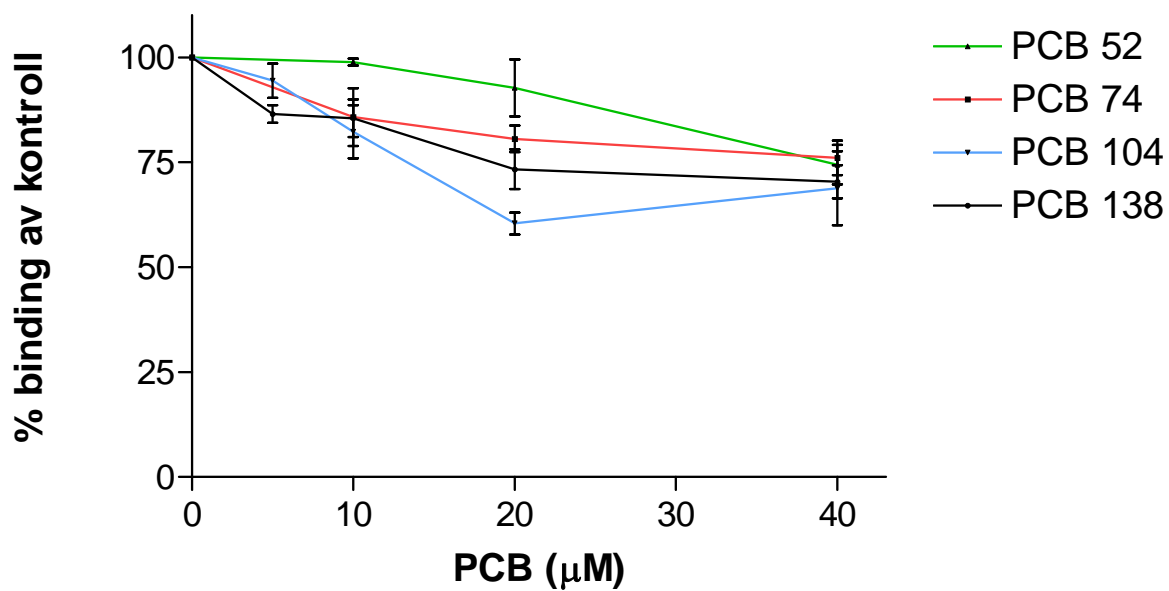


Figur 3.8 Effekt av PCB 28, 47, 51, 100 og 101 på DAT-binding i synaptosomer isolert fra rotte cerebrum. Hvert punkt viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre eller fire forsøk utført i triplikat. Synaptosomer og 5 nM [ $^3$ H]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C i 120 min.

PCB 19, 95, 136 og 190 viste moderat hemming av DAT-binding. 40 µM av disse PCBene hemmet DAT-binding med omtrent 40 %, men i lavere konsentrasjoner viste de ulik aktivitet (figur 3.9). Bare PCB 101 ga sterkere hemming av DAT-binding enn PCB 190 ved 10 µM PCB, men effekten til PCB 190 økte ikke med økende PCB konsentrasjon. Tilsetning av PCB 190 til en sluttkonsentrasjon på 10, 20 og 40 µM resulterte i 34, 40 og 39 % hemming av binding til DAT. PCB 52, 74, 104 og 138 ga svak, men signifikant hemming av DAT-binding (figur 3.10). 40 µM av disse PCBene hemmet DAT-binding med omtrent 30 % (figur 3.10).

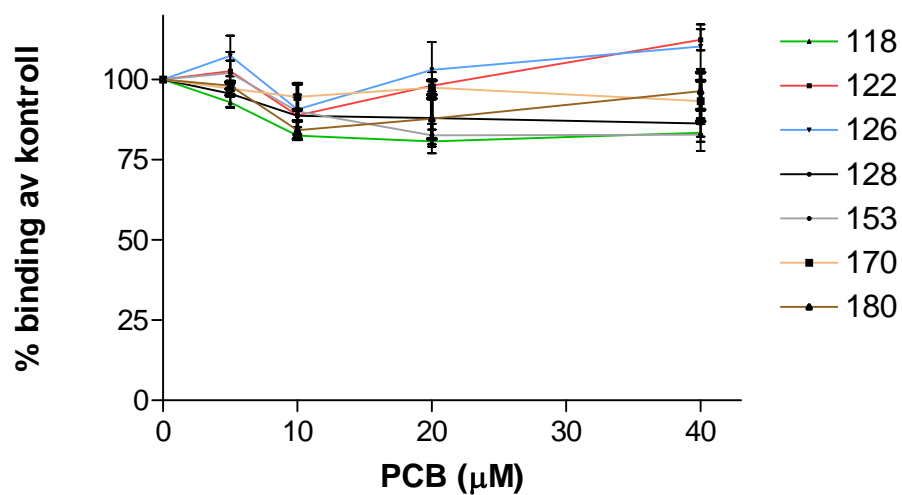


Figur 3.9 Effekt av PCB 19, 95, 136 og 190 på DAT-binding i synaptosomer isolert fra rotteccerebrum. Hvert punkt viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre eller fire forsøk utført i triplikat. Synaptosomer og 5 nM [ $^3$ H]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C i 120 min.



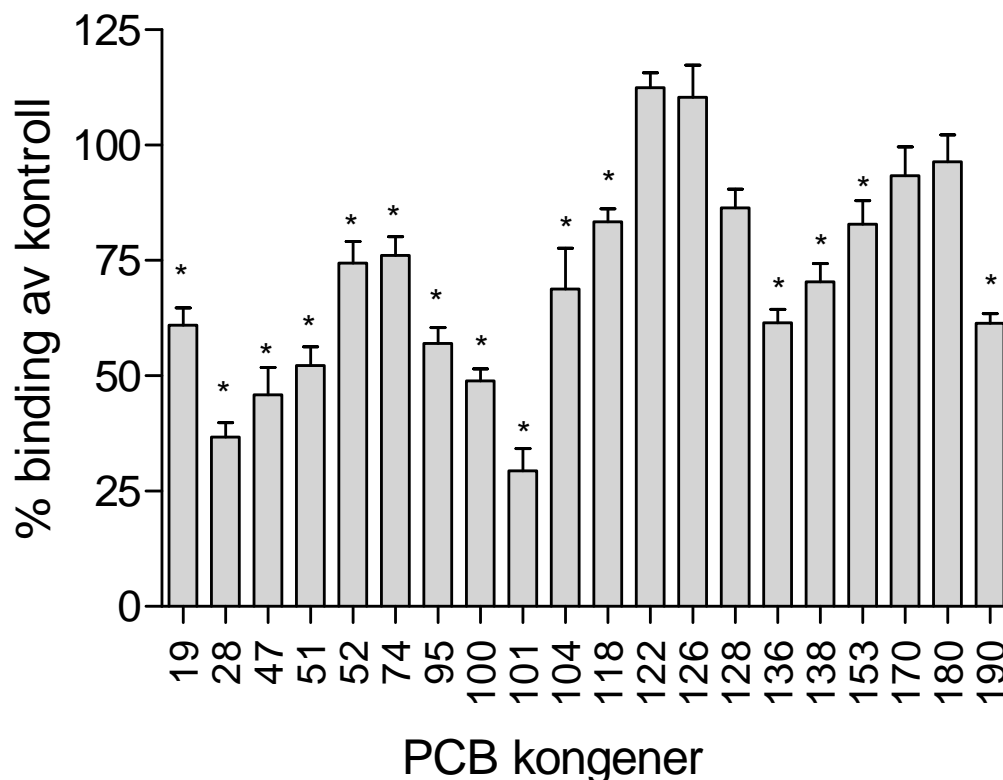
Figur 3.10 Effekt av PCB 52, 74, 104 og 138 på DAT-binding i synaptosomer isolert fra rotteccerebrum. Hvert punkt viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre eller fire forsøk utført i triplikat. Synaptosomer og 5 nM [ $^3$ H]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C i 120 min.

PCB 122, 126, 128, 153, 170 og 180 viste liten effekt på DAT-binding i synaptosomer isolert fra cerebrum (figur 3.11).



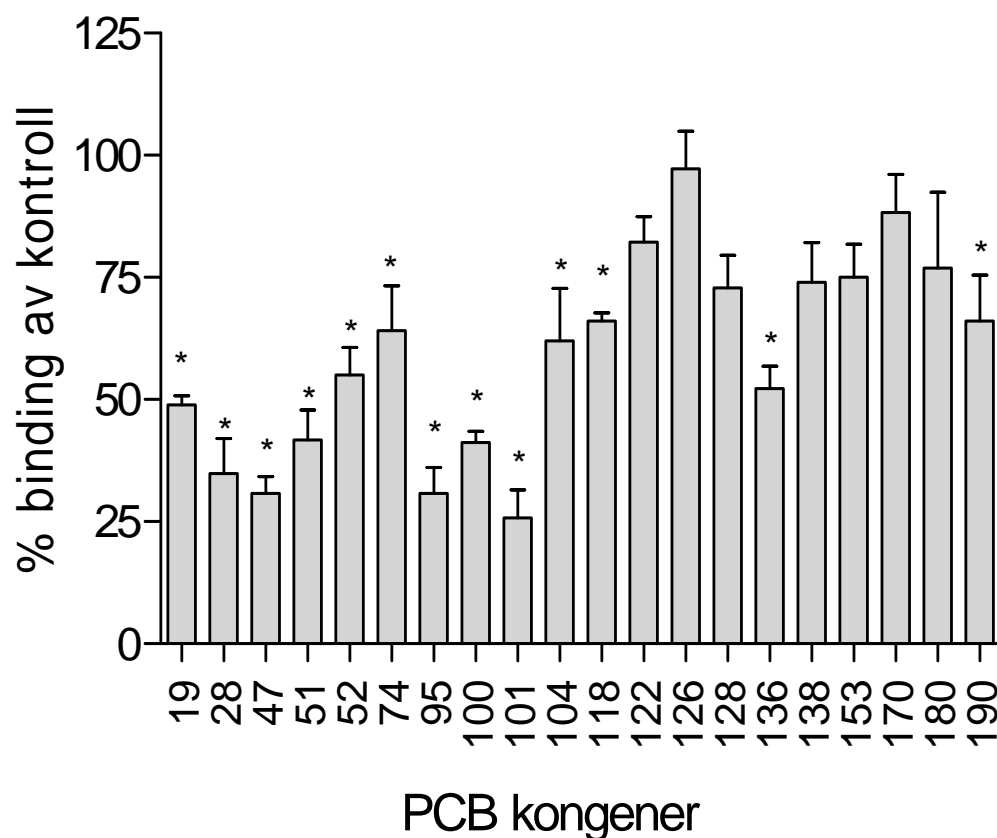
Figur 3.11 Effekt av PCB 118, 122, 126, 128, 153, 170 og 180 på DAT-binding i synaptosomer isolert fra rottecebrum. Hvert punkt viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre eller fire forsøk utført i triplikat. Synaptosomer og 5 nM [ $^3$ H]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C i 120 min.

PCB-kongenerenes effekt ved 40  $\mu\text{M}$  i synaptosomer isolert fra cerebrum vises i figur 3.12 for sammenlikning av kongenerenes aktivitet på DAT-binding. 15 av 20 PCB-kongenerer hemmet DAT-binding ved 40  $\mu\text{M}$  PCB i cerebrum (Figur 3.12).

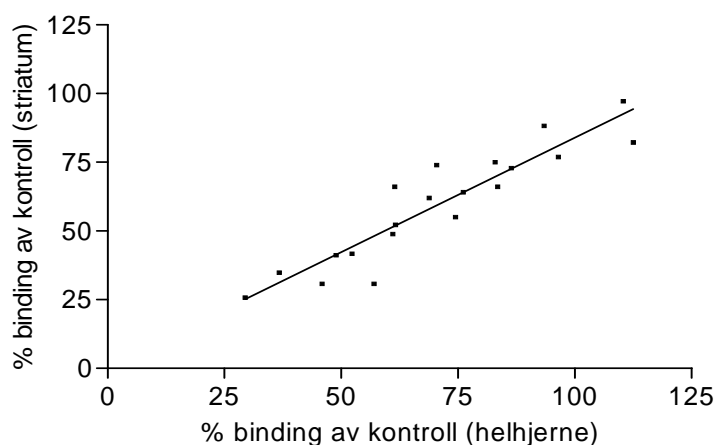


Figur 3.12 Effekt av PCB-kongenerer (40  $\mu\text{M}$ ) på DAT-binding i synaptosomer isolert fra cerebrum. Hver stolpe viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre forsøk utført i triplikat. Synaptosomer (0.9 mg/ml protein) og 5 nM [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428 ble inkubert ved 4  $^{\circ}\text{C}$  i 120 min. \*  $p < 0.05$ , forskjell fra kontroll beregnet med ANOVA enveis test (Dunnets test)

Effekten av ulike PCB-kongenerer (10  $\mu\text{M}$ ) på DAT-binding i synaptosomer isolert fra striatum er vist i figur 3.13. I synaptosomer fra striatum ble DAT-binding hemmet i større grad enn i synaptosomer fra cerebrum. Det var likevel god korrelasjon mellom hver enkelt PCB-kongeners effekt på DAT-binding i synaptosomer fra cerebrum, og i synaptosomer fra striatum (figur 3.14). PCBs *in vitro* hemming av transmitteropptak er tidligere funnet å synke med økt vevsmengde (Mariussen and Fonnum, 2001). Årsaken kan være at PCB fordeler seg i det økte membranmaterialet. I prøver med synaptosomer isolert fra striatum ble det brukt 3.5 ganger lavere proteinkonsentrasjon enn i prøver med synaptosomer isolert fra cerebrum. Dette er antakelig forklaringen på at 10  $\mu\text{M}$  PCB ga tilsvarende hemming av DAT-binding i synaptosomer fra striatum som 40  $\mu\text{M}$  PCB i synaptosomer fra cerebrum (figur 3.14).



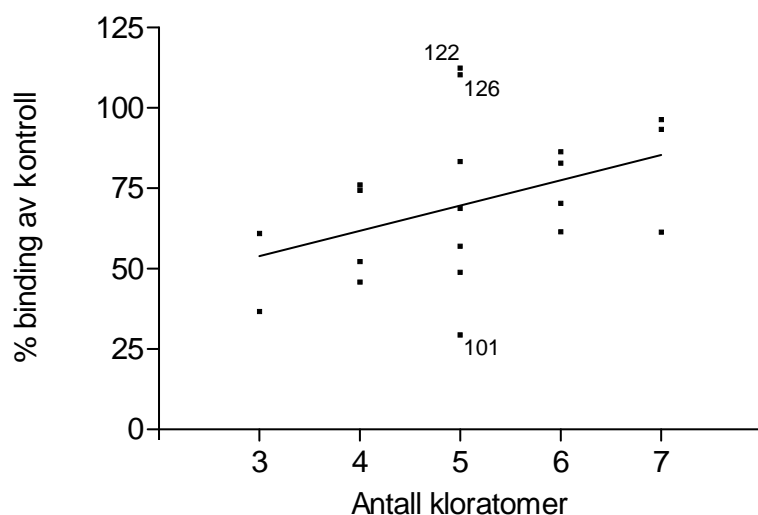
Figur 3.13 Effekt av PCB-kongenerer (10  $\mu$ M) på DAT-binding i synaptosomer isolert fra striatum. Hver stolpe viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre eller fire forsøk utført i triplikat. Synaptosomer (0,25 mg/ml protein) og 5 nM [ $^3$ H]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C i 120 min. \*  $p < 0.05$ , forskjell fra kontroll beregnet med ANOVA enveis test (Dunnets test)



Figur 3.14 DAT-binding ved 40  $\mu$ M PCB i synaptosomer isolert fra cerebrum plottet mot DAT-binding ved 10  $\mu$ M PCB i synaptosomer isolert fra striatum. Hvert punkt representerer én av 20 undersøkte PCB-kongenerer. Synaptosomer og 5 nM [ $^3$ H]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C i 120 min. Cerebrum- og striatumprøvene inneholdt henholdsvis 0.9 mg/ml protein og 0.25 mg/ml protein.  $r^2 = 0.85$ , lineær regresjonsanalyse.

### 3.1.3 Struktur aktivitet

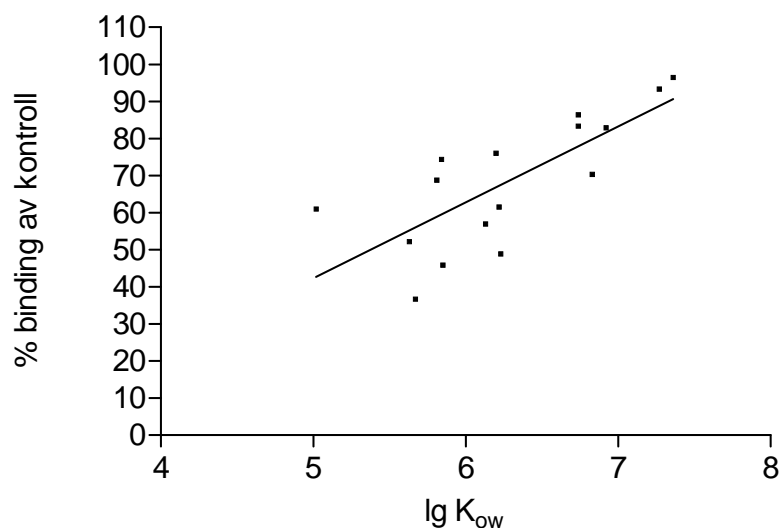
PCB-kongenerenes effekt ved 40  $\mu\text{M}$  i synaptosomer isolert fra cerebrum, ble brukt som utgangspunkt for struktur aktivitet analysen. PCBene med størst aktivitet på DAT-binding var tri-, tetra- og pentaklorete. PCB 101 viste større hemming av binding til DAT enn andre kongenerer. PCB 101 er pentaklorete og diorthosubstituert. PCBene med liten aktivitet på DAT-binding var penta-, hekso og heptaklorete. Hemmingsaktivitet ble sammenliknet med antall klor- og orthoatomer, fettløselighet og fysikalsk-kjemiske parametere som ”absolute hardness” og ”barrier of internal rotation”. Figur 3.15 viser antall kloratomer på PCBene mot deres effekt på DAT-binding. Bindingsaktivitet var omvendt proporsjonal med kloreringsgrad, men korrelasjonen var svak. PCB 101, 122 og 126 divergerte fra relasjonen.



Figur 3.15 DAT-binding ved 40  $\mu\text{M}$  PCB i synaptosomer isolert fra cerebrum plottet mot antall kloratomer. Hvert punkt representerer én av 20 undersøkte PCB-kongenerer. Synaptosomer og 5 nM [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C i 120 min.  $r^2 = 0.17$ , lineær regresjonsanalyse.

Figur 3.16 viser at PCB-kongenerenes effekt på DAT-binding var omvendt proporsjonal med partisjonering i oktanol-vannfase ( $K_{ow}$ ). Fettløselighet ( $K_{ow}$ ) var den enkeltfaktor som spilte størst rolle for å forklare PCB-kongenerenes effekt på DAT-binding. Det bør nevnes at det er en klar sammenheng mellom antall kloratomer på PCB og fettløselighet. Effekten til PCB 101, 122, 126 og 190 divergerte fra relasjonen til fettløselighet, og ble utelatt fra korrelasjonen. PCB 101, 122 og 126 divergerte også fra relasjonen mellom bindingsaktivitet og antall kloratomer.

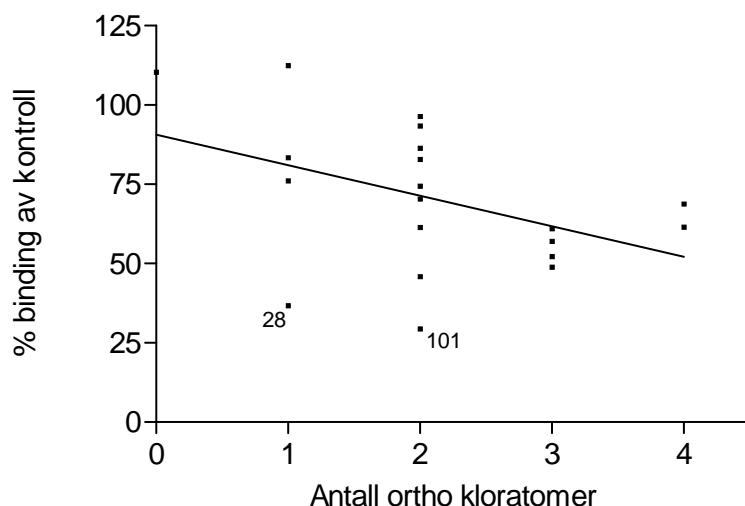




Figur 3.16 DAT-binding ved 40  $\mu$ M PCB i synaptosomer isolert fra cerebrum plottet mot  $\log K_{ow}$ . Hvert punkt representerer én av 20 undersøkte PCB-kongenerer. Synaptosomer og 5 nM [ $^3$ H]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C i 120 min.  $r^2 = 0.57$ , lineær regresjonsanalyse. PCB 101, 122, 126 og 190 ble utelatt.

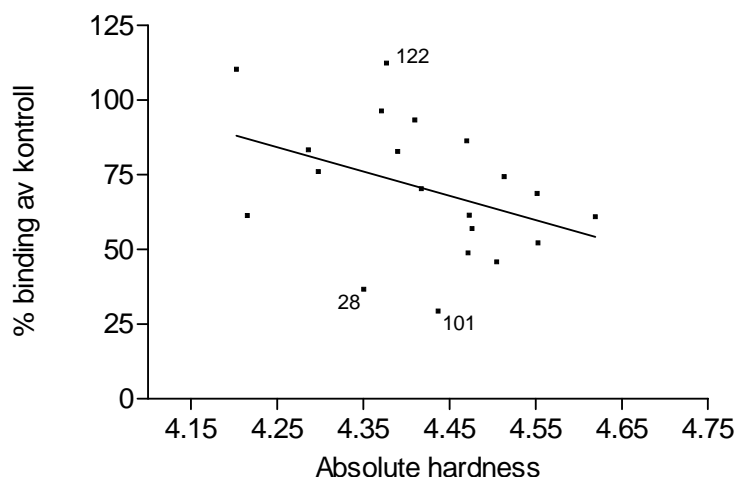
Figur 3.17 viser forholdet mellom *ortho*-klorering og effekt på DAT-binding.

Bindingsaktivitet var proporsjonal med *ortho*-klorering, men korrelasjonen var svak. PCB 28 og 101 divergerte fra relasjonen. PCB 28, 47 og 101 viste sterk bindingsaktivitet og er mono- og di*ortho*-klorerte.



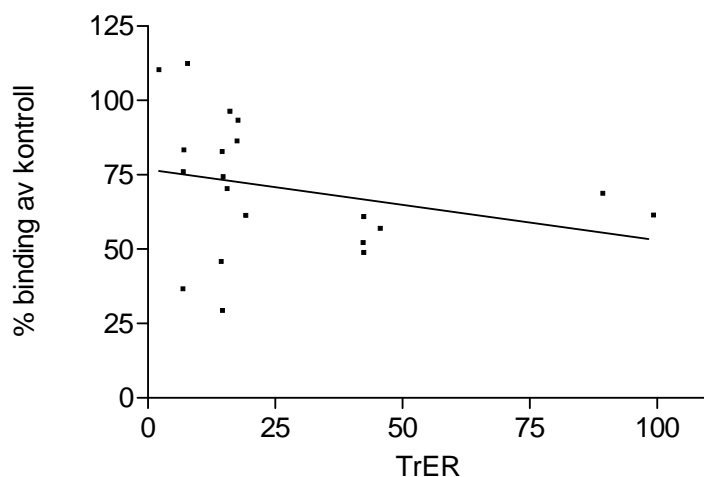
Figur 3.17 DAT-binding ved 40  $\mu$ M PCB i synaptosomer isolert fra cerebrum plottet mot antall *ortho*-kloratomer. Hvert punkt representerer én av 20 undersøkte PCB-kongenerer. Synaptosomer og 5 nM [ $^3$ H]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C i 120 min.  $r^2 = 0.18$ , lineær regresjonsanalyse.

PCB-kongenerenes bindingsaktivitet var proporsjonal med ”absolute hardness”, men med svak korrelasjon (figur 3.18). PCB 28, 101 og 122 divergerte fra relasjonen med ”absolute hardness”. ”Absolute hardness” avhenger av molekylets elektroniske egenskaper og en høy ”absolute hardness” verdi er en indikasjon på høy stabilitet og lav reaktivitet.



Figur 3.18 DAT-binding ved 40  $\mu\text{M}$  PCB i synaptosomer isolert fra cerebrum plottet mot ”absolute hardness”. Hvert punkt representerer én av 20 undersøkte PCB-kongenerer. Synaptosomer og 5 nM [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C i 120 min.  $r^2 = 0.15$ , lineær regresjonsanalyse.

Figur 3.19 viser forholdet mellom PCB-kongenerenes effekt på DAT-binding og ”barrier of internal rotation”. ”Barrier of internal rotation” avhenger av antall *ortho*-kloratomer, men korrelerte ikke med PCB-kongenerenes bindingsaktivitet.



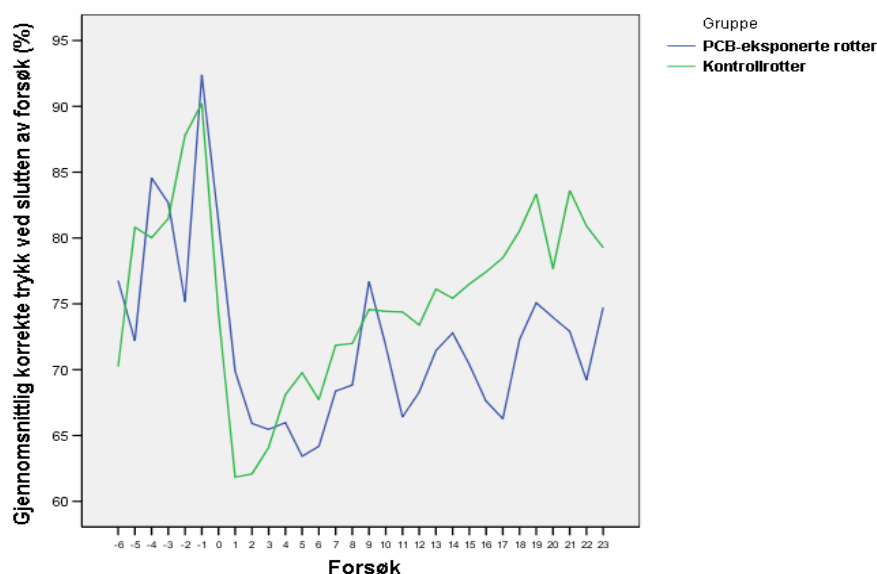
Figur 3.19 DAT-binding ved 40  $\mu\text{M}$  PCB i synaptosomer fra cerebrum plottet mot ”barrier of internal rotation”. Hvert punkt representerer én av 20 undersøkte PCB-kongenerene. Synaptosomer og 5 nM [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C i 120 min.  $r^2 = 0.07$ , lineær regresjonsanalyse.

## 3.2 Effekt av PCB-eksponering under hjernens utvikling på DAT og D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptorbinding

### 3.2.1 Atferdsstudie etter PCB-eksponering under hjernens utvikling

Rotter eksponert for PCB-blandingen Aroclor 1254 og en kontrollgruppe, ble testet med en visuell diskrimineringsoppgave. To hendler ble presentert, og trykk på korrekt hendel (signalisert ved lys over hendelen) ga tilgang til en belønning i form av en vanndråpe. Trykk på feil hendel fikk ingen konsekvenser. Hvilken av hendlene som var korrekt varierte tilfeldig, men var alltid signalisert med lys. Andel korrekte trykk ble brukt som et mål på rottens oppmerksomhet overfor lyssignalet.

Kontrollrottene ble funnet å øke sin andel korrekte trykk med et økende antall forsøk bak seg (figur 3.20). I innlæringsfasen med hyppig belønning (forsøk < 0) viste rotter eksponert for PCB tilsvarende læringskurve som kontrollrottene, men ved sjelden belønning (forsøk > 0) fikk de problemer. De PCB-eksponerte rottene trengte hyppig belønning for å huske betydningen av lyssignalet, og dette ble tolket som nedsatt oppmerksomhetsevne. Prestasjonene til rottene eksponert for PCB liknet resultatet fra tidligere forsøk med en dyremodell for ADHD. Resultatene fra den visuelle diskrimineringsstudien danner grunnlaget for mine målinger av D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptor og DAT-binding i hjernehomogenat fra de samme rottene.



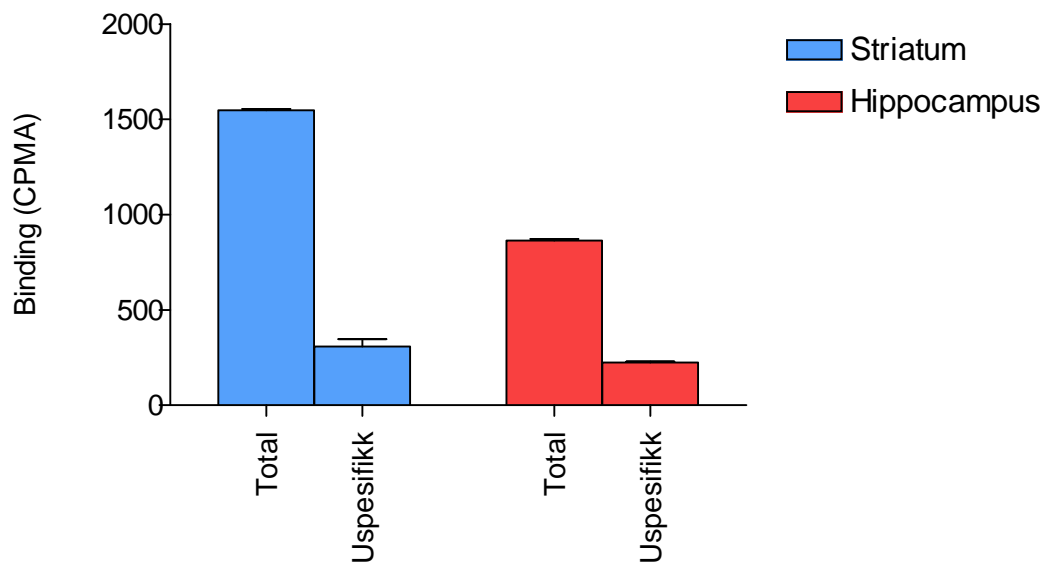
Figur 3.20 Belønning i visuell diskrimineringsoppgave ble gitt etter to forskjellige protokoller. Ved de første forsøksdagene (forsøk < 0), ble belønning gitt for hvert eneste korrekte trykk. Senere ble belønning bare gitt ved enkelte korrekte trykk, gjennomsnittlig hvert 3 minutt (forsøk > 0)

---

### 3.2.2 Innledende metodeforsøk

Måling av binding til  $D_1/D_5$ -reseptor og DAT i hjernedeler fra tidligere PCB-eksponerte rotter var kun en innledende studie basert på etablerte metoder i vårt laboratorium. Bare enkle forsøk ble derfor utført for å bekrefte at metodene fungerte med parameterendringene beskrevet nedenfor. Videre målinger av  $D_1/D_5$ -reseptor og DAT-binding i rotter eksponert for PCB vil kreve grundigere metodeutprøving. Måling av binding til DAT ble utført som beskrevet i kapittel 2.4.3, men i homogenat istedenfor i synaptosomer.

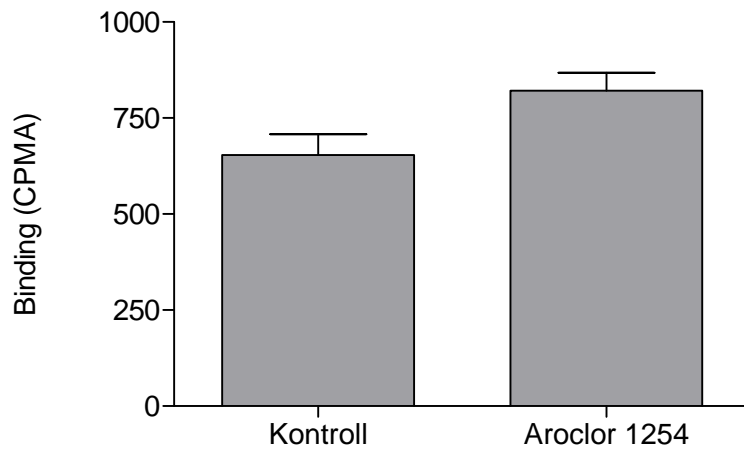
For å kunne måle  $D_1/D_5$ -reseptor og DAT-binding i hjernedeler fra én enkelt rotte ble det forsøkt å øke isolert mengde  $D_1/D_5$ -reseptor og DAT. I flere tidligere prosedyrer for fremstilling av homogenat inkuberes homogenatet ved 37 °C for å fjerne endogene ligander (von Euler, 1991). For å beskytte DAT og  $D_1/D_5$ -reseptor reduserte vi temperaturen til 25 °C. Tidligere metoder har fremstilt homogenat med relativt forsiktig sentrifugering (22000 g i 20 min), men med kraftig sentrifugering (100000 g i 30 min) økte vi oppkonsentrert mengde  $D_1/D_5$ -reseptor og DAT, og gjorde det mulig å måle binding i materiale fra én rotte. For å redusere nødvendig mengde vev i hver prøve ble prøvevolumet for måling av  $D_1/D_5$ -reseptorbinding nedskalert til 200 µl. Hippocampus inneholder relativt lite  $D_1/D_5$ -reseptor og det var en utfordring å oppnå høy spesifikk og lav uspesifikk binding i denne hjernedelen. I hippocampus-homogenat fjernet 5 x 5 ml skylling av filteret mye uspesifikk binding, mens 3 x 5 ml skylling var tilstrekkelig for striatum-homogenat. Tilsetning av [ $^3$ H]SCH 23390 til en sluttkonsentrasjon på 1 nM resulterte i høy spesifikk og lav uspesifikk binding i hippocampusprøver, mens 2 nM [ $^3$ H]SCH 23390 ga et tilsvarende forhold mellom spesifikk og uspesifikk binding i striatumprøver. Med endringene i de nevnte parametere oppnådde vi ca 80 % spesifikk binding ved måling av  $D_1/D_5$ -reseptor i homogenat fra striatum og hippocampus (figur 3.21). DAT-binding i homogenat viste samme prosent spesifikk binding som tidligere vist i synaptosomer, dvs. ca 80 %.



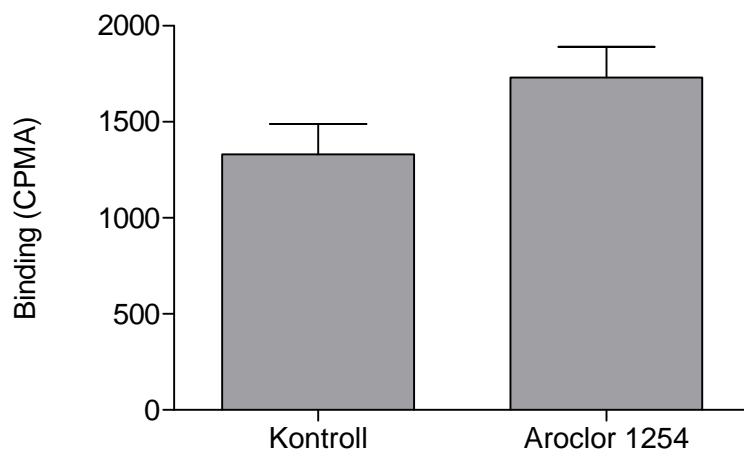
Figur 3.21  $D_1/D_5$ -reseptorbinding i homogenat fra striatum og hippocampus. Stolpene viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av to forsøk utført i duplikat eller triplikat. Homogenat fra striatum (0.3 mg/ml protein) og 2 nM [ $^3H$ ]SCH 23390 ble inkubert ved 25 °C i 30 min. Reaksjonen i striatumhomogenat ble avsluttet med 3x2 ml skylling. Homogenat fra hippocampus (0.6 mg/ml protein) og 1 nM [ $^3H$ ]SCH 23390 ble inkubert ved 25 °C i 30 min. Reaksjonen i hippocampushomogenat ble avsluttet med 5x2 ml skylling.

### 3.2.3 $D_1/D_5$ -reseptorbinding

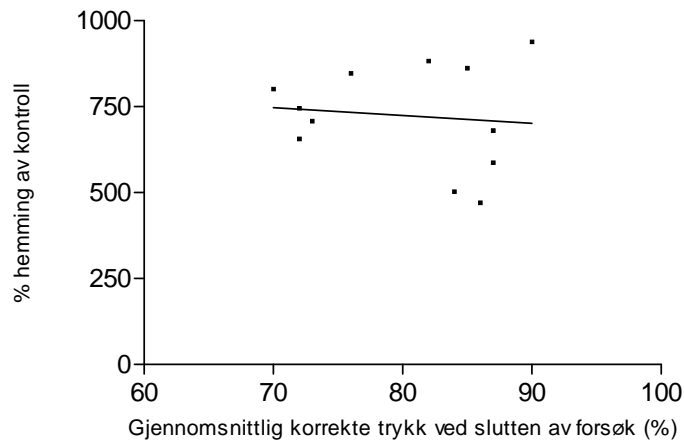
Endringer i nivået av  $D_1/D_5$ -reseptor i hjernen ble målt ved å studere binding av [ $^3H$ ]SCH 23390. Figur 3.22 viser ca 25 % høyere  $D_1/D_5$ -reseptorbinding i homogenat fra PCB-eksponerte rotters hippocampus enn hos kontrollrotter ( $p = 0.053$ ). Det ble ikke funnet noen sammenheng mellom prestasjoner i atferdsforsøket og  $D_1/D_5$ -reseptorbinding i hippocampus (figur 3.24 og 3.25). Figur 3.23 viser ca 30 % høyere  $D_1/D_5$ -reseptorbinding i homogenat fra PCB-eksponerte rotters striatum enn hos kontrollrotter ( $p = 0.09$ ). Det ble heller ikke funnet noen sammenheng mellom prestasjoner i atferdsforsøket og  $D_1/D_5$ -reseptorbinding i striatum (figur 3.25).



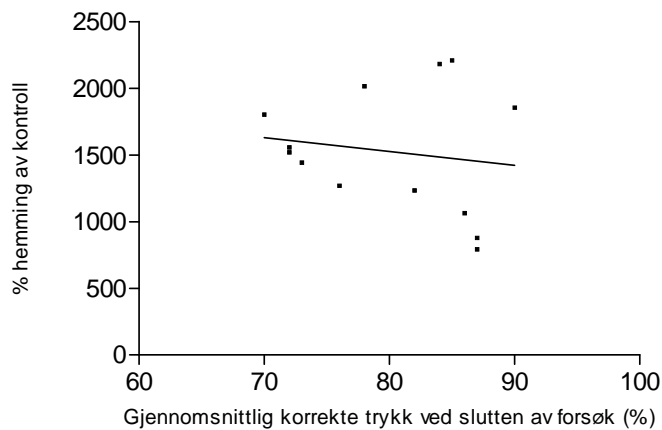
Figur 3.22  $D_1/D_5$ -reseptorbinding i homogenat fra hippocampus. Stolpene viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 7 kontrollrotter og av 5 rotter eksponert for Aroclor 1254 under hjernens utvikling. Rottene ble undersøkt i to forsøk utført triplikat. Homogenat og 1 nM [ $^3$ H]SCH 23390 ble inkubert ved 25 °C i 30 min.  $p = 0.053$ , uparret  $t$ -test.



Figur 3.23  $D_1/D_5$ -reseptorbinding i homogenat fra striatum. Stolpene viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 8 kontrollrotter og av 5 rotter eksponert for Aroclor 1254 under hjernens utvikling. 2 av kontrollrottene ble bare undersøkt i ett forsøk utført i triplikat. De andre rottene ble undersøkt i to eller tre forsøk utført i duplikat. Homogenat og 2 nM [ $^3$ H]SCH 23390 ble inkubert ved 25 °C i 30 min.  $p = 0.09$ , uparret  $t$ -test.



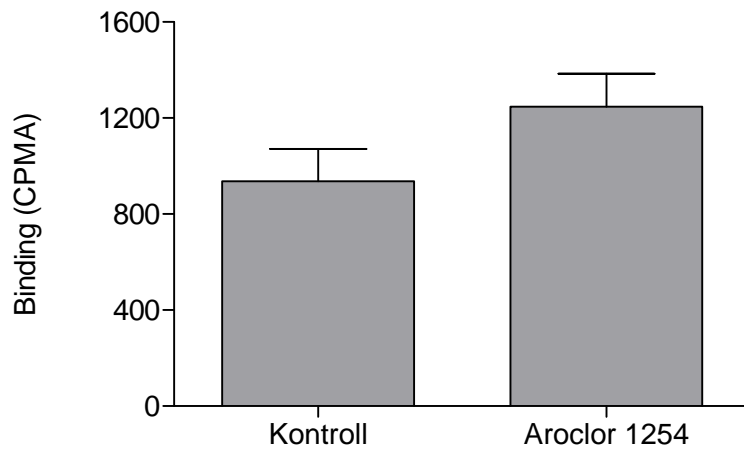
Figur 3.24 Gjennomsnittlig korrekte trykk i visuell diskrimineringsoppgave plottet mot  $D_1/D_5$ -reseptorbinding i homogenat fra hippocampus. Hvert punkt representerer én av 12 undersøkte rotter. Homogenat og 1 nM [ $^3$ H]SCH 23390 ble inkubert ved 25 °C i 30 min.  $r^2=0.011$ , lineær regresjonsanalyse.



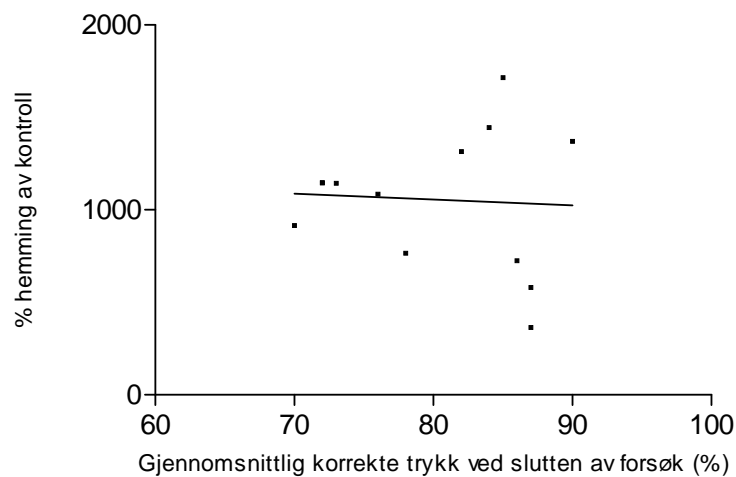
Figur 3.25 Andel korrekte trykk i visuell diskrimineringsoppgave plottet mot  $D_1/D_5$ -reseptorbinding i homogenat fra striatum. Hvert punkt representerer én av 13 undersøkte rotter. Homogenat og 2 nM [ $^3$ H]SCH 23390 ble inkubert ved 25 °C i 30 min.  $r^2=0.024$ , lineær regresjonsanalyse.

### 3.2.4 DAT-binding

Endringer i nivået av DAT i hjernen ble målt ved å studere binding av [ $^3$ H]WIN 35,428. Figur 3.26 viser ca 30 % høyere DAT-binding i homogenat fra PCB-eksponerte rotters striatum enn hos kontrollrotter ( $p = 0.15$ ). Det ble ikke funnet noen sammenheng mellom prestasjoner i atferdsforsøket og DAT-binding (figur 3.27).



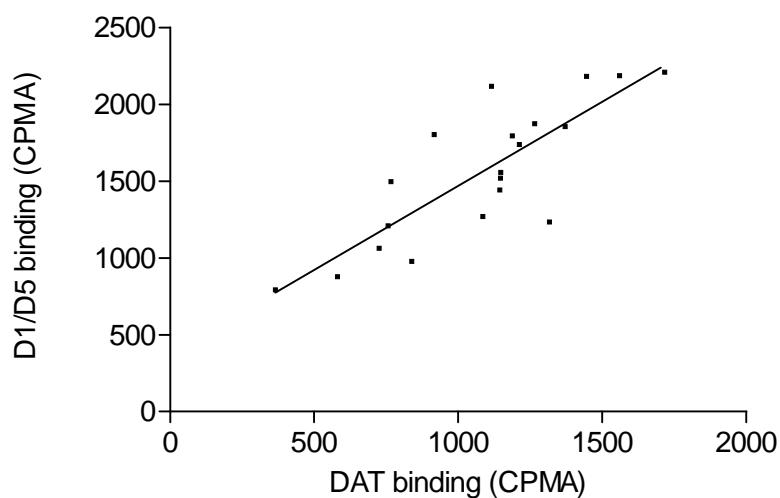
Figur 3.26 DAT-binding i homogenat fra striatum. Stolpene viser gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 8 kontrollrotter og av 5 rotter eksponert for Aroclor 1254 under hjernens utvikling. Rottene ble undersøkt i to forsøkt utført i triplikat. Homogenat og 5 nM [ $^3$ H]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C i 120 min.  $p = 0.15$ , uparret t-test.



Figur 3.27 Andel korrekte trykk i visuell diskrimineringsoppgave plottet mot DAT-binding i homogenat fra striatum. Hvert punkt representerer én av 13 undersøkte rotter. Homogenat og 5 nM [ $^3$ H]WIN 35,428 ble inkubert ved 4 °C i 120 min.  $r^2 = 0.003$ , lineær regresjonsanalyse.



Figur 3.28 viser en korrelasjon mellom DAT og D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptorbinding i striatum. At DAT og D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptorbinding varierte i samme retning kan skyldes små effekter fra disseksjonen.



Figur 3.28 DAT-binding i homogenat fra striatum plottet mot D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptorbinding i homogenat fra striatum. Hvert punkt representerer én av 20 undersøkte rotter. 5 nM [<sup>3</sup>H]WIN 35,428 og homogenat ble inkubert ved 4 °C i 120 min. 2 nM [<sup>3</sup>H]SCH 23390 og homogenat ble inkubert ved 25 °C i 30 min.  $r^2=0.68$ , lineær regresjonsanalyse.

---

## 4. DISKUSJON

I denne oppgaven har det blitt vist at PCB hemmer binding til DAT *in vitro*. Som enkeltfaktor utøvde fettløselighet størst innflytelse på PCB-kongenerenes aktivitet på DAT-binding. Det ble undersøkt om PCB eksponering under hjernens utvikling innvirket på DAT- eller D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptornivå i voksen alder. En tendens til høyere DAT og D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptorbinding ble funnet i visse deler av hjernen etter tidlig postnatal PCB-eksponering.

### 4.1 Utvikling av metode for måling av DAT-binding

Det viktigste kriteriet for en vellykket radioligandbindingsstudie er at radioliganden binder sitt spesifikke målprotein. [<sup>3</sup>H]WIN 35,428 er DAT-spesifikk (Madras et al., 1989; Reith and Coffey, 1994), og binder DAT med høy affinitet og lav dissosiasjonsrate (Reith and Coffey, 1994). Videre er bestemmelsen av spesifikk binding avgjørende. Nomifensin blokkerte DAT (Dubocovich and Zahniser, 1985) og definerte uspesifikk [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-binding. Spesifikk [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-binding ble beregnet ved å subtrahere uspesifikk fra total [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-binding. Konsentrasjonen av [<sup>3</sup>H]WIN 35,428 og vevsmengde ble variert enkeltvis for å optimalisere metoden, men også for å bekrefte at bindingen av [<sup>3</sup>H]WIN 35,428 sammenfalt med bindingsteori. En nøkkelobservasjon var at spesifikk [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-binding ble mettet av økende [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-konsentrasjon. Teoretisk sett begrenses spesifikk binding av et bestemt antall bindings seter. Med økende radioligandkonsentrasjon forventes derfor spesifikk binding å nå et punkt der alle bindings seter er opptatt, og å flate ut slik [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-bindingen gjør i figur 3.2. Uspesifikk binding begrenses teoretisk sett ikke av et bestemt antall bindings seter, men domineres av fenomener som binding til filter, adsorpsjon til vev og oppløsning i membranlipider. Som forventet økte uspesifikk [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-binding lineært med økende [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-konsentrasjon (figur 3.2). I bindingsstudier med konkurrerende forbindelser anbefales det å bruke lavere radioligandkonsentrasjon enn radioligandens affinitet ( $k_d$ ) (Bylund and Toews, 1993). Binding av [<sup>3</sup>H]WIN 35,428 estimeres med  $k_d = 6,58$  nM (Caudle et al., 2006), og 5 nM [<sup>3</sup>H]WIN 35,428 syntes som et rimelig valg av radioligandkonsentrasjon for vår metode.

Det ble funnet en lineær økning av spesifikk [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-binding med økende vevsmengde (figur 3.1), også dette i henhold til teorien. Den spesifikke bindingen begrenses av et bestemt antall bindings seter, men økt vevsmengde gir flere bindings seter. I en

---

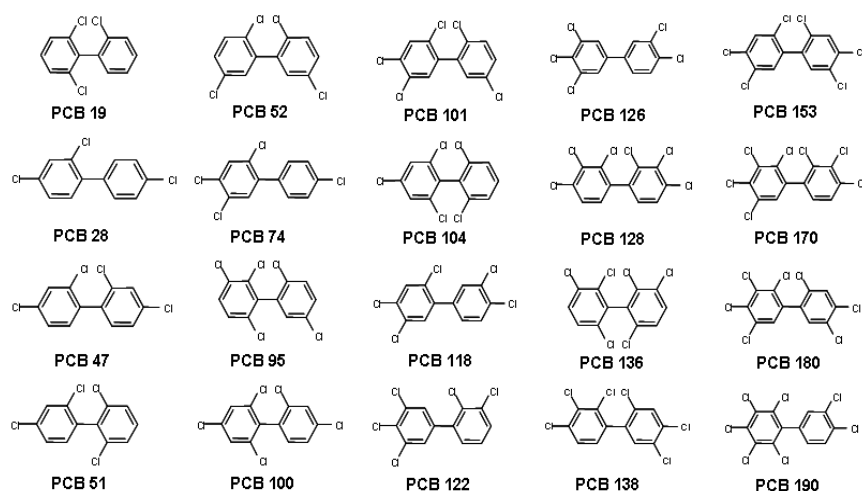
fungerende bindingsmetode vil derfor spesifikk binding øke lineært med vevsmengde. Ved å måle radioligandbinding i høy vevsmengde kan forholdet spesifikk/uspesifikk binding optimaliseres, mens en reduksjon av vev i prøvene åpner for at flere forsøk kan utføres med hjernevev fra én enkelt rotte. Det hevdes at proteinkonsentrasjonen er for høy hvis bundet radioaktivitet utgjør over 10 % av tilsatt radioaktivitet (Bylund and Toews, 1993). Proteinkonsentrasjonen som ble valgt til måling av DAT-binding ga en total binding på omtrent 3 % av tilsatt radioligand.

For å undersøke om bindingen til DAT var spesifikk, målte vi [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-binding i ulike hjernedeler. Binding av [<sup>3</sup>H]WIN 35,428 i striatum, cerebrum, cerebellum og hippocampus ble funnet å korrelere med tidligere observerte dopaminnivåer i de respektive hjernedeler (Dahlin et al., 2007; Moore and Bloom, 1978). Dette indikerte at [<sup>3</sup>H]WIN 35,428 var DAT-spesifikk. Striatum inneholder mye dopamin (Moore and Bloom, 1978) og høy grad av spesifikk [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-binding ble målt i striatum. Det er lite dopamin i cerebellum (Moore and Bloom, 1978), og lav grad av spesifikk [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-binding ble observert. For bekreftelsen av [<sup>3</sup>H]WIN 35,428 som DAT-spesifikk var observasjonen av lav spesifikk [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-binding i hippocampus særlig viktig. Hippocampus har relativt lav dopamin-, men høy noradrenalkonsentrasjon (Dahlin et al., 2007; Moore and Bloom, 1978, 1979), og våre data fra denne hjernedelen tydet på liten grad av [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-binding til noradrenalintransportøren. Dette var en viktig observasjon fordi [<sup>3</sup>H]WIN 35,428 er rapportert å hemme både dopamin- ( $k_i = 26.1$  nM) og noradrenalintransport ( $k_i = 31.9$  nM) over plasmamembranen (Torres et al., 2003). Nomifensin har en viss affinitet for noradrenalintransportøren, men regnes også som DAT-spesifikk (Dubocovich and Zahniser, 1985). Det er tidligere rapportert at [<sup>3</sup>H]WIN 35,428 binder to ulike bindingsseter: et lav- ( $k_d = 65$  nM) og et høyaffinitetssete ( $k_d = 5.3$  nM) (Kirifides et al., 1992). Om begge bindingssetene observeres, er oppgitt å avhenge av vaskeprosedyren (Izenwasser et al., 1993), mens andre har hevdet at lavaffinitetssetet er en artefakt som følge av nedfrysing av vev (Kirifides et al., 1992). Det tidligere observerte lavaffinitetssetet angis å binde [<sup>3</sup>H]WIN 35,428 med så lav affinitet ( $k_d = 65$  nM) at det uansett vil ha liten praktisk betydning for vår metode.

I innledende metodestudier ble det funnet høyere spesifikk [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-binding etter inkubasjon ved 4 °C enn ved 25 °C, kanskje fordi plasseringen av [<sup>3</sup>H]WIN 35,428 i bindingsetet var mer termodynamisk gunstig ved 4 °C. Lavere temperatur gir lavere

reaksjonshastighet i bindingslikevekten, og dette kan tenkes å øke resterende spesifikk [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding etter vaskeprosedyren. [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding var tilnærmet lik etter inkubering i 30, 120 og 180 minutter, men det ble valgt å inkubere i 120 minutter av praktiske hensyn. Inkubasjonen ble avsluttet med plassering av prøvene på et filter, og rask skylling for separering av bundet og ubundet [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428. Skyllingen av filteret kan også fjerne bundet radioligand, men spesifikk og uspesifikk binding fjernes ikke nødvendigvis i samme grad. Det ble utviklet en skylleprosedyre som skylte vekk uspesifikk [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding uten å fjerne spesifikk [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding tilsvarende.

## 4.2 Effekt av PCB på DAT-binding *in vitro*



Figur. 4.1 Strukturen til undersøkte PCB-kongenerer.

PCB-kongenerenes hemming av binding til DAT var omvendt proporsjonal med fettløselighet. Fettløselighet hadde størst forklaringsverdi som enkeltfaktor på DAT-bindingsaktivitet, men PCB 101, 122, 126 og 190 divergerte fra relasjonen. PCB 101 viste sterkere hemming av DAT-binding enn forventet med sin moderate fettløselighet, og hemmet binding til DAT i større grad enn andre undersøkte kongenerer. PCB 101 har samme struktur som PCB 153, men med et *para*-kloratom mindre (figur 4.1). Den sterke effekten til PCB 101 på DAT-binding viste at fravær av dette *para*-kloratomet på PCB 153 endret DAT-bindingsaktivitet fra svak til sterk. PCB 52 har samme struktur som PCB 101, men besitter et *para*-kloratom mindre enn PCB 101. Den sterke effekten til PCB 101 på DAT-binding viste at addisjon av *para*-kloratomet i strukturen til PCB 52 endret DAT-bindingsaktivitet fra svak til sterk. PCB 101 er mer fettløselig enn PCB 52, og er fra korrelasjonen med fettløselighet

---

forventet å gi svakere DAT-bindingshemming enn PCB 52. Det er interessant at PCB 52 og 153, selv med en lignende struktur som PCB 101, fulgte korrelasjonen mellom DAT-bindingshemming og fettløselighet. Den lave effekten til PCB 52 og 153 i forhold til den strukturelt liknende PCB 101, kan forklares med at PCB 52 og 153 er symmetriske og har lave dipolmomenter, men symmetriske PCB 47 og 136 gir vesentlig hemming av DAT-binding. Kanskje er det heller slik at PCB 101 besitter en klorplassering som gir PCB-molekylet en spesielt gunstig konformasjon i DAT-bindingssetet.

*Ortho*substitusjon er viktig for PCBs nevrotoksiske effekt (Kodavanti and Tilson, 1997), og *nonortho*-klorerte PCBer har tidligere blitt funnet å være uten hemmingsaktivitet på dopaminopptak i synaptosomer (Mariussen and Fonnum, 2001). At de *nonortho*-klorerte PCBene besitter lav nevrotoksisk effekt, antas å skyldes deres planare konfigurasjon. PCB 126 er *nonortho*-klorert, og uten effekt på dopaminopptak gjennom DAT (tabell 4.1). Det var derfor ikke overraskende at PCB 126 heller ikke viste noen effekt på DAT-binding i våre målinger (figur 3.11). PCB-kongenerene med *monoortho*-klorering kan innta en plan-, men også en ikke-plan konfigurasjon. PCB 122 er én av fire *monoorthokongenerer*. Blant disse hadde PCB 74, 118 og 122 begrenset aktivitet på DAT-binding, mens PCB 28, med lav fettløselighet viste høy DAT-bindingsaktivitet.

Det ble undersøkt om PCB-kongenerenes hemming av DAT-binding korrelerte med antall kloratomer i strukturen. Det ble funnet en svakere korrelasjon mellom bindingsaktivitet og kloreringsgrad, enn mellom bindingsaktivitet og fettløselighet. De undersøkte kongenerenes fettløselighet avhenger av kloreringsgrad og det er interessant at to parametere som henger tett sammen er ulike i sin evne til å forklare DAT-bindingsaktivitet. At korrelasjonen til kloreringsgrad var svakere enn til fettløselighet, kan skyldes at fettløselighet avhenger av flere faktorer enn kloreringsgrad. I tillegg til kloreringsgrad vil plasseringen av kloratomene i PCB strukturen påvirke fettløselighet.

Det ble videre testet om kongenerenes DAT-bindingsaktivitet korrelerte med antall *ortho*-kloratomer. Et økende antall *ortho*-kloratomer vil øke dreiningen av de to fenylgruppene i PCB-strukturen, samt legge store restriksjoner på dreiningen. Aktivitet på DAT-binding viste seg å være proporsjonal med *ortho*-klorering, men korrelasjonen var svak. Våre data synes derfor å understreke at en ikke-planar form er viktig, men at dreiningsvinkelen har lite betydning. I overensstemmelse med dette ble ingen korrelasjon funnet mellom barrieren mot

PCB-fenylringens frie rotasjon, beskrevet av "barrier of internal rotation", og hemming av DAT-binding. Dette tydet på at PCBene, så lenge de ikke inntok en plan konfigurasjon, var i stand til å hemme DAT-binding uansett barriere mot fenylringens rotasjon.

I tillegg til de nevnte strukturelle egenskaper, kan ladningen fordelt over PCB-forbindelsen være viktig for bindingshemming. "Absolute hardness" beskriver elektroniske egenskaper i PCB molekylet. PCB-kongenerenes aktivitet på DAT-binding viste seg å være proporsjonal med aktivitet på DAT-binding, men også den med svak korrelasjon.

Tidligere studier med et begrenset antall PCBer, har vist at PCB hemmer dopaminopptak i synaptosomer *in vitro* (Mariussen and Fonnum, 2001). Funnene i denne oppgaven viser at PCB hemmer dopaminopptak i synaptosomer gjennom å hemme binding til DAT. Det vil derfor være interessant å sammenligne PCBs hemming av DAT-binding og dopaminopptak i synaptosomer. Det har ikke blitt kalkulert  $IC_{50}$ -verdier for PCBs hemming av binding til DAT, og dette legger begrensninger på sammenlikningen. Det er også et poeng at  $IC_{50}$ -verdier avhenger av forsøksbetingelser, og således ikke er egnet for direkte kvantitativ sammenlikning på tvers av ulike metoder uansett. Med de tilgjengelige data bør vi heller diskutere PCB-kongenerenes innbyrdes rangering som hemmere av henholdsvis dopaminopptak og DAT-binding. Tabell 4.1 viser effekten av de PCB-kongenerer som foreløpig er testet for sin effekt på både DAT-binding og dopaminopptak i synaptosomer.

Tabell 4.1  $IC_{50}$ -verdier ( $\mu M$ ) for dopaminopptak i synaptosomer, og % DAT-binding av kontroll ved eksponering for 40  $\mu M$  PCB i synaptosomer. Begge studier ble utført med vev fra cerebrum, men ellers ulike forsøksbetingelser.

	<b><math>IC_{50}</math> for dopaminopptak (<math>\mu M</math>)</b>	<b>DAT-binding av kontroll (%)</b>
<b>PCB 19</b>	12,6 <sup>a</sup>	61 <sup>c</sup>
<b>PCB 51</b>	10,4 <sup>b</sup>	52 <sup>c</sup>
<b>PCB 104</b>	22,4 <sup>b</sup>	69 <sup>c</sup>
<b>PCB 126</b>	>50 <sup>a</sup>	110 <sup>c</sup>
<b>PCB 153</b>	>50 <sup>a</sup>	83 <sup>c</sup>
<b>PCB 190</b>	>50 <sup>a</sup>	61 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Resultater fra Mariussen et al (2001)

<sup>b</sup> Upubliserte resultater fra Espen Mariussen

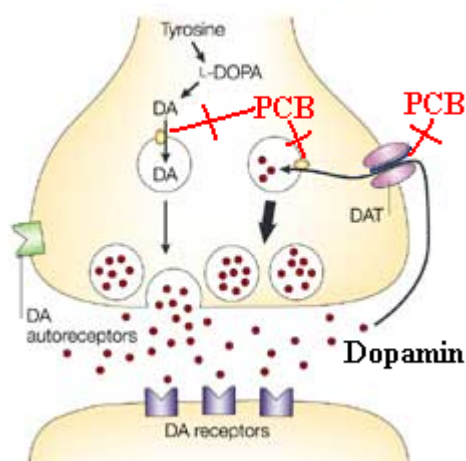
<sup>c</sup> Resultater fra denne studien

---

PCB 19, 51 og 104 hemmet både synaptosomalt dopaminopptak og DAT-binding i synaptosomer, og deres aktivitet ble rangert likt i begge tilfeller (tabell 4.1). PCB 190 hemmet DAT-binding allerede i lav konsentrasjon, men høyere PCB 190 konsentrasjoner ga ikke økt hemming av DAT-binding (figur 3.9). PCB 190 er tidligere funnet å hemme dopaminopptak i synaptosomer ved lave konsentrasjoner, men effekten på dopaminopptak stagnerte tilsvarende som på DAT-binding med økt PCB 190 konsentrasjon. Denne informasjonen kommer ikke til uttrykk ved å rapportere effekt på dopaminopptak med en isolert  $IC_{50}$  verdi på  $>50 \mu M$  (Mariussen and Fonnum, 2001). Ved en grundigere sammenligning av effekten til PCB 190 i ulike konsentrasjoner, fremstår ikke aktiviteten til PCB 190 så ulik på dopaminopptak og DAT-binding som tabell 4.1 antyder.

Seegal et al. (2002) eksponerte voksne rotter for PCB blandingen Aroclor 1254 (25 mg/kg/dag), og målte ekstracellulær dopamin ved mikrodialyse. Etter å ha eksponert rottene for PCB i tre dager observerte Seegal en økning av det ekstracellulære dopaminnivået, sannsynligvis en akutt konsekvens av at PCB hemmet dopaminopptak over plasmamembranen (Mariussen and Fonnum, 2001). Dette bekrefter funnene i denne oppgaven, nemlig at PCB hemmer dopaminopptak gjennom å hemme dopamins binding til DAT.

Caudle et al. (2006) eksponerte voksne mus for en 1:1 blanding av Aroclor 1254 og 1260 (0, 7.5 eller 15 mg/kg/dag) og bestemte DAT-nivå ved Western blotting og med  $[^3H]WIN$  35,428-binding. Caudle observerte en doseavhengig nedgang i DAT og VMAT2-nivå etter PCB-eksponering, men først etter 14 dagers eksponering. Ved eksponering for PCB over lengre tid er det tidligere også funnet en nedgang i ekstracellulær dopamin: etter 1, 2 og 8 ukers eksponering for Aroclor 1254, observerte Seegal et lavere ekstracellulært dopaminnivå i forhold til kontroll (Seegal et al., 2002). Denne nedgangen i ekstracellulært dopamin etter langtids eksponering kan skyldes at PCB hemmer dopaminsyntese eller opptaket av dopamin til synaptiske vesikler (VMAT2) (Mariussen et al., 1999). Det har blitt foreslått at langvarig hemming av DAT og VMAT2 forstyrrer fordelingen av dopamin i vesikler, cytosol og ekstracellulært (figur 4.2), og at dette gir økt oksidativ skade og nedregulering av DAT og VMAT2. Nedreguleringen, spesielt av VMAT2, vil kunne øke oksideringen av dopamin ytterligere, og over tid redusere dopaminnivået. Den PCB-induserte hemmingen av DAT-binding beskrevet i denne oppgaven er i så fall et tidlig trinn i en lengre toksisk kaskade av hendelser.



Figur 4.2 Skjematisk fremstilling av kretsløpet til dopamin (DA) fra vesikler ut i synapsespalten, reopptak i nervecellen og transport inn i vesikkelen igjen. PCB er vist å kunne hemme dopamintransport over plasmamembranen og inn i synaptiske vesikler.

Det kan reises spørsmål om hvorvidt PCB-effektene vi har observert på DAT-binding *in vitro* er overførbare til situasjoner *in vivo*. PCB 95, 118, 138, 153 og 180 er tidligere funnet å akkumuleres i hjernen til PCB-eksponerte dyr i større grad enn andre PCB-kongenerer (Caudle et al., 2006; Kodavanti et al., 1998). Blant disse har PCB 95 vist sterk hemming av binding til DAT (figur 3.9). Det er få konsentrasjonsmålinger av PCB i hjernen. Hos polarmåker på Svalbard er det målt konsentrasjoner opp til 45  $\mu\text{M}$  PCB i hjernen. Disse fuglene var også tydelig påvirket av PCB-eksponering. Det foreligger få data fra menneskehjernen, men de rapporterte nivåene av PCB er lave (Dewailly et al., 1999). I polarmåker er det derfor klart at PCBs effekt på DAT-binding er reel, mens betydningen i menneskehjernen gjenstår å kartlegges.

PCB er tidligere rapportert å påvirke  $\text{Ca}^{2+}$ -homeostase, redusere protein kinase C-aktivitet, hemme nitrogenoksyd syntase, indusere apoptose, øke dannelsen av reaktive oksygenforbindelser og ha nevroendokrine effekter (Mariussen and Fonnum, 2006). Det kan nesten virke som om PCB er i stand til å påvirke alle systemene som stoffgruppen er testet i. Situasjonen kompliseres ytterligere ved at PCB er en gruppe med 209 forskjellige kongenerer. Med forskjellig struktur og fysisk-kjemiske egenskaper kan disse ha ulike nedbrytningstid og fordeling i naturen, ulikt opptak og fordeling i menneskekroppen, ulike virkninger, mekanismer og potens.



---

### 4.3 Effekt av PCB-eksponering under hjernens utvikling på DAT og D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptorbinding

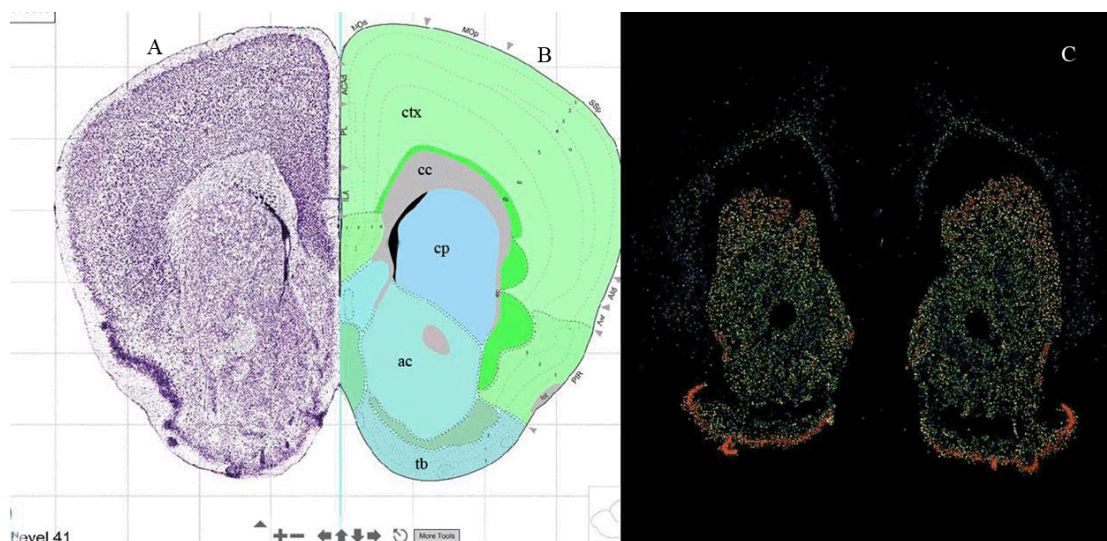
Det var av flere grunner interessant å lete etter dopaminerge endringer i de utvalgte hjernedelene. Striatum antas å spille en sentral rolle i patofysiologien ved ADHD, og de PCB-eksponerte rottene viste nettopp ADHD-liknende symptomer. Som nevnt knyttes ADHD til forstyrrelser i det dopaminerge system. Det ble derfor valgt å måle DAT og D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptorkonsentrasjon i striatum. Det er videre funnet en forandring av langtids-potensiering (LTP) i visse deler av hippocampus hos SHR-rotter, en dyremodell for ADHD (Hvalby Ø., personlig meddelelse). LTP forandringen kunne relateres til dopaminerge reseptorer. Vi valgte derfor å måle D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptorkonsentrasjon i hippocampus.

Det ble funnet større grad av binding til DAT i striatum, og til D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptor i striatum og hippocampus, hos rotter eksponert for PCB enn hos kontrollene, men forskjellene var ikke signifikante ( $p = 0.15$ ,  $0.09$  og  $0.053$ , respektivt). Det må her bemerkes at færre rotter var tilgjengelige for målinger enn opprinnelig planlagt. Det var påfallende at de observerte dopaminerge bindingsforskjellene mellom PCB-eksponerte rotter og kontroller beveget seg i samme retning, og var av samme størrelsesorden (ca 30 %). I både PCB og kontrollgruppen viste rottene individuelle atferdsforskjeller, men ingen sammenheng ble funnet mellom prestasjon i atferdsstudien og binding til DAT og D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptor. Atferd knyttes til flere integrerte og bare delvis kartlagte signalsystemer i hjernen. Kanskje er det lite fruktbart å lete etter korrelasjoner mellom nivået av isolerte komponenter, som DAT og D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>-reseptor av ett enkelt transmittersystem, og komplisert atferd.

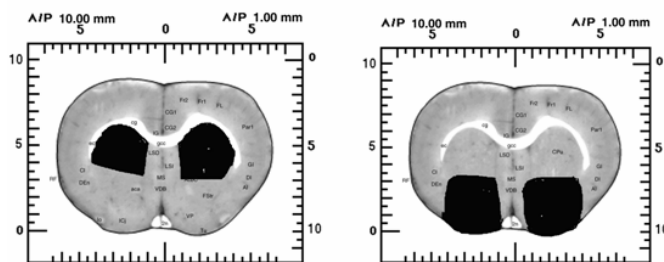
Som beskrevet tidligere eksponerte Caudle et al. (2006) voksne mus for 7.5 mg/kg PCB daglig (1:1 Aroclor 1254 og 1260). Først etter 14 dagers eksponering ble det observert en endring i hjernens DAT-nivå, og da en reduksjon. Rottene i vår studie ble eksponert for 10 mg/kg PCB (Aroclor 1254) gitt 3 ganger mellom postnatal dag 10 og 20. Dette er en langt lavere total dose enn rottene til Caudle et al. (2006) ble eksponert for. Til forskjell fra Caudle, som eksponerte voksne mus for PCB, ble PCB i denne studien gitt under hjernens utvikling. Den tidlige postnatale fasen er sårbar fordi verken blodhjernebarrieren eller sentralnervesystemet er ferdig utviklet. Det er også et poeng at Caudle et al. (2006) utførte sine målinger én dag etter siste PCB-eksponering, i motsetning til denne studien hvor rottene

ble avlivet 6 uker etter siste eksponering for PCB. En endring som observeres 6 uker etter PCB-eksponering er mest sannsynlig en stabil forandring, mens Caudle et al. (2006) kanskje observerte en mer direkte og kanskje kortvarig effekt av PCB-eksponering. En eventuell endring i DAT-konsentrasjon over tid har ukjent mekanisme, men kan være resultatet av adaptive forandringer indusert av et dopaminsystem i ubalanse. Det er tidligere rapportert at utfallet av PCB-eksponering på dopaminnivå i hjernen avhenger av om det er voksne dyr, eller dyr under utvikling som blir eksponert (Seegal, 1994). Dersom dopaminnivået kan skyves i ulike retninger avhengig av alder ved eksponering, er det mulig at effekten på DAT-nivå varierer tilsvarende med eksponeringstidspunkt. At DAT-nivået i hjernen ser ut til å øke etter PCB-eksponering under hjernens utvikling, mens det synker etter voksen PCB-eksponering (Caudle et al., 2006), er derfor ikke nødvendigvis motstridende funn.

Det var stor variasjon i grad av DAT og  $D_1/D_5$ -reseptorbinding innad i både kontrollgruppen og blant rottene eksponert for PCB. Dette kan skyldes unøyaktighet ved disseksjon av striatum. Figur 4.3 viser fordeling av  $D_1/D_5$ -reseptorer i striatum. Den høye  $D_1/D_5$ -reseptorkonsentrasjonen nær disseksjonssnittet for ventralstriatum gjorde det vanskelig å kontrollere dissekert mengde  $D_1/D_5$ -reseptor. Problemet kunne vært unngått ved å dissekere bare dorsalstriatum (figur 4.4).



Figur 4.3 Frontalsnitt av rottehjernen 2 mm foran bregma. A = cellefarging av snitt gjennom hjernen ved caudate putamen. B = skjematisk fremstilling av ulike strukturer i hjernen. ac - accumbens, cc - corpus callosum, cp - caudate putamen, ctx - cortex, tb - tuberculum. C = fordeling av  $D_1/D_5$ -reseptor i rostralstriatum (markert med rødt). <http://www.brain-map.org>



Figur 4.4 Frontalsnitt av rottehjernen. Dorsalstriatum er markert med svart i det venstre snittet, mens ventralstriatum er markert i snittet til høyre. <http://www.brain-map.org>

## 4.4 Oppsummering

PCB hemmet binding til DAT i synaptosomer fra rottehjerne, og PCB-kongenerene viste ulike evner til å hemme DAT-binding. PCBs aktivitet på DAT-binding var omvendt proporsjonal med fettløselighet, og fettløselighet var isolert sett den viktigste faktoren for effekten til de undersøkte PCB-ene. En tendens til høyere DAT og  $D_1/D_5$ -reseptorbinding ble funnet i visse deler av hjernen etter PCB eksponering under hjernens utvikling.

## 4.5 Forslag til videre arbeid

- Måle [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428-binding i synaptosomer isolert fra striatum ved flere PCB konsentrasjoner.
- Utføre kinetiske bindingsstudier med [ $^3\text{H}$ ]WIN 35,428 og PCB-kongenerer for å kartlegge mekanismen bak hemming av DAT-binding.
- Måle DAT-binding og dopaminopptak i synaptosomer i tilnærmet samme forsøksoppsett for å sammenlikne PCB-kongenerenes effekt på DAT-binding og dopaminopptak. Metode for slik sammenlikning er beskrevet av Xu et al. (1995)
- Utføre en større studie av DAT og  $D_1/D_5$ -reseptornivå etter PCB eksponering under hjernens utvikling hos rotte.

---

Alousi, A., and Weiner, N. (1966). The regulation of norepinephrine synthesis in sympathetic nerves: effect of nerve stimulation, cocaine, and catecholamine-releasing agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56, 1491-1496.

Bemis, J.C., and Seegal, R.F. (2004). PCB-induced inhibition of the vesicular monoamine transporter predicts reductions in synaptosomal dopamine content. *Toxicol Sci* 80, 288-295.

Biederman, J., and Faraone, S.V. (2002). Current concepts on the neurobiology of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Atten Disord* 6 Suppl 1, S7-16.

Brodal, P. (2004). The central nervous system, structure and function, 3rd edn (Oxford University Press).

Bush, B., Snow, J., and Koblitz, R. (1984). Polychlorobiphenyl (PCB) congeners, p,p'-DDE, and hexachlorobenzene in maternal and fetal cord blood from mothers in Upstate New York. *Arch Environ Contam Toxicol* 13, 517-527.

Bylund, D.B., and Toews, M.L. (1993). Radioligand binding methods: practical guide and tips. *Am J Physiol* 265, 421-429.

Caudle, W.M., Richardson, J.R., Delea, K.C., Guillot, T.S., Wang, M., Pennell, K.D., and Miller, G.W. (2006). Polychlorinated Biphenyl-Induced Reduction of Dopamine Transporter Expression as a Precursor to Parkinson's Disease-Associated Dopamine Toxicity. *Toxicol Sci* 92, 490-499.

Coffey, L.L., and Reith, M.E. (1994). [3H]WIN 35,428 binding to the dopamine uptake carrier. I. Effect of tonicity and buffer composition. *J Neurosci Methods* 51, 23-30.

Cragg, S.J., and Rice, M.E. (2004). DANCING past the DAT at a DA synapse. *Trends Neurosci* 27, 270-277.

Dahlin, A., Xia, L., Kong, W., Hevner, R., and Wang, J. (2007). Expression and immunolocalization of the plasma membrane monoamine transporter in the brain. *Neuroscience* 146, 1193-1211.

Dewailly, E., Mulvad, G., Pedersen, H.S., Ayotte, P., Demers, A., Weber, J.P., and Hansen, J.C. (1999). Concentration of organochlorines in human brain, liver, and adipose tissue autopsy samples from Greenland. *Environ Health Perspect* 107, 823-828.

Dougherty, D.D., Bonab, A.A., Spencer, T.J., Rauch, S.L., Madras, B.K., and Fischman, A.J. (1999). Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 354, 2132-2133.

Dresel, S., Krause, J., Krause, K.H., LaFougere, C., Brinkbaumer, K., Kung, H.F., Hahn, K., and Tatsch, K. (2000). Attention deficit hyperactivity disorder: binding of [99mTc]TRODAT-1 to the dopamine transporter before and after methylphenidate treatment. *Eur J Nucl Med* 27, 1518-1524.

Dubocovich, M.L., and Zahniser, N.R. (1985). Binding characteristics of the dopamine uptake inhibitor [3H]nomifensine to striatal membranes. *Biochem Pharmacol* 34, 1137-1144.

- 
- Faraone, S.V., and Khan, S.A. (2006). Candidate gene studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry* 67 Suppl 8, 13-20.
- Fein, G.G., Jacobson, J.L., Jacobson, S.W., Schwartz, P.M., and Dowler, J.K. (1984). Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls: effects on birth size and gestational age. *J Pediatr* 105, 315-320.
- Fischer, J.F., and Cho, A.K. (1979). Chemical release of dopamine from striatal homogenates: evidence for an exchange diffusion model. *J Pharmacol Exp Ther* 208, 203-209.
- Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42, 1-11.
- Gladen, B.C., Rogan, W.J., Hardy, P., Thullen, J., Tingelstad, J., and Tully, M. (1988). Development after exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene transplacentally and through human milk. *J Pediatr* 113, 991-995.
- Gomara, B., Bordajandi, L.R., Fernandez, M.A., Herrero, L., Abad, E., Abalos, M., Rivera, J., and Gonzalez, M.J. (2005). Levels and trends of polychlorinated dibenzo-p-dioxins/furans (PCDD/Fs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Spanish commercial fish and shellfish products, 1995-2003. *J Agric Food Chem* 53, 8406-8413.
- Gray, E.G., and Whittaker, V.P. (1962). The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Anat* 96, 79-88.
- Greengard, P. (2001). The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294, 1024-1030.
- Gulley, J.M., and Zahniser, N.R. (2003). Rapid regulation of dopamine transporter function by substrates, blockers and presynaptic receptor ligands. *Eur J Pharmacol* 479, 139-152.
- Hersch, S.M., Yi, H., Heilman, C.J., Edwards, R.H., Levey, A.I., Hersch, S.M., Yi, H., Heilman, C.J., Edwards, R.H., and Levey, A.I. (1997). Subcellular localization and molecular topology of the dopamine transporter in the striatum and substantia nigra. *J Comp Neurol* 388, 211-227.
- Hsu, S.T., Ma, C.I., Hsu, S.K., Wu, S.S., Hsu, N.H., Yeh, C.C., Wu, S.B. (1985). Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: a four-year followup. *Environ Health Perspect* 59, 5-10.
- Hökfelt, T., Johansson, O., Fuxe, K., Goldstein, M., and Park, D. (1976). Immunohistochemical studies on the localization and distribution of monoamine neuron systems in the rat brain. I. Tyrosine hydroxylase in the mes- and diencephalon. *Med Biol* 54, 427-453.
- Izenwasser, S., Rosenberger, J.G., and Cox, B.M. (1993). The cocaine analog WIN 35,428 binds to two sites in fresh rat caudate-putamen: significance of assay procedures. *Life Sci* 52, 141-145.
- Jacobson, J.L., and Jacobson, S.W. (1996). Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *N Engl J Med* 335, 783-789.

- 
- Jensen, S. (1966). Report of a new chemical hazard. *New Sci* 32, 612
- Kahlig, K.M., and Galli, A. (2003). Regulation of dopamine transporter function and plasma membrane expression by dopamine, amphetamine, and cocaine. *Eur J Pharmacol* 479, 153-158.
- Kapur, S. (2004). How antipsychotics become anti-"psychotic"--from dopamine to salience to psychosis. *Trends Pharmacol Sci* 25, 402-406.
- Kirifides, A.L., Harvey, J.A., and Aloyo, V.J. (1992). The low affinity binding site for the cocaine analog, WIN 35,428 is an artifact of freezing caudate tissue. *Life Sci* 50, 139-142.
- Kodavanti, P.R., and Tilson, H.A. (1997). Structure-activity relationships of potentially neurotoxic PCB congeners in the rat. *Neurotoxicology* 18, 425-441.
- Kodavanti, P.R., Ward, T.R., Derr-Yellin, E.C., Mundy, W.R., Casey, A.C., Bush, B., and Tilson, H.A. (1998). Congener-specific distribution of polychlorinated biphenyls in brain regions, blood, liver, and fat of adult rats following repeated exposure to Aroclor 1254. *Toxicol Appl Pharmacol* 153, 199-210.
- Kontur, P.J., al-Tikriti, M., Innis, R.B., and Roth, R.H. (1994). Postmortem stability of monoamines, their metabolites, and receptor binding in rat brain regions. *J Neurochem* 62, 282-290.
- Krnjevic, K. (1970). Glutamate and [gamma]-Aminobutyric Acid in Brain. *Nature* 228, 119-124.
- Kuratsune, M., Yoshimura, T., Matsuzaka, J., and Yamaguchi, A. (1971). Yusho, a poisoning caused by rice oil contaminated with polychlorinated biphenyls. *HSMHA Health Rep* 86, 1083-1091.
- La Rocca, C., and Mantovani, A. (2006). From environment to food: the case of PCB. *Ann Ist Super Sanita* 42, 410-416.
- Madras, B.K., Spealman, R.D., Fahey, M.A., Neumeyer, J.L., Saha, J.K., and Milius, R.A. (1989). Cocaine receptors labeled by [3H]2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-fluorophenyl)tropane. *Mol Pharmacol* 36, 518-524.
- Mariussen, E., and Fonnum, F. (2001). The effect of polychlorinated biphenyls on the high affinity uptake of the neurotransmitters, dopamine, serotonin, glutamate and GABA, into rat brain synaptosomes. *Toxicology* 159, 11-21.
- Mariussen, E., and Fonnum, F. (2006). Neurochemical targets and behavioral effects of organohalogen compounds: an update. *CRC Crit Rev Toxicol* 36, 253-289.
- Mariussen, E., Mørch Andersen, J., and Fonnum, F. (1999). The effect of polychlorinated biphenyls on the uptake of dopamine and other neurotransmitters into rat brain synaptic vesicles. *Toxicol Appl Pharmacol* 161, 274-282.
- Masson, J., Sagne, C., Hamon, M., and El Mestikawy, S. (1999). Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 51, 439-464.

---

Meador-Woodruff, J.H., Mansour, A., Bunzow, J.R., Van Tol, H.H., Watson, S.J., Jr., and Civelli, O. (1989). Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7625-7628.

Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., and Caron, M.G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78, 189-225.

Moine, C.L., and Bloch, B. (1995). D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: Sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol* 355, 418-426.

Moore, R.Y., and Bloom, F.E. (1978). Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annu Rev Neurosci* 1, 129-169.

Moore, R.Y., and Bloom, F.E. (1979). Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annu Rev Neurosci* 2, 113-168.

Nirenberg, M.J., Vaughan, R.A., Uhl, G.R., Kuhar, M.J., and Pickel, V.M. (1996). The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurosci* 16, 436-447.

Reith, M.E., and Coffey, L.L. (1994). [3H]WIN 35,428 binding to the dopamine uptake carrier. II. Effect of membrane fractionation procedure and freezing. *J Neurosci Methods* 51, 31-38.

Rogan, W.J., Gladen, B.C., Hung, K.L., Koong, S.L., Shih, L.Y., Taylor, J.S., Wu, Y.C., Yang, D., Ragan, N.B., and Hsu, C.C. (1988). Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan. *Science* 241, 334-336.

Rogan, W.J., Gladen, B.C., McKinney, J.D., Carreras, N., Hardy, P., Thullen, J., Tinglestad, J., and Tully, M. (1986). Neonatal effects of transplacental exposure to PCBs and DDE. *J Pediatr* 109, 335-341.

Safe, S. (1990). Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *CRC Crit Rev Toxicol* 21, 51-88.

Sand, O., Sjaastad, Ø.V., and Haug, E. (2001). *Menneskets fysiologi*, 1th edn (Gyldendal Norsk Forlag AS).

Sawaguchi, T., and Goldman-Rakic, P.S. (1991). D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. *Science* 251, 947-950.

Seegal, R.F. (1994). The neurochemical effects of PCB exposure are age-dependent. *Arch Toxicol Suppl* 16, 128-137.

Seegal, R.F. (1996). Can epidemiological studies discern subtle neurological effects due to perinatal exposure to PCBs? *Neurotoxicol Teratol* 18, 251-254.

- 
- Seegal, R.F., Bush, B., and Brosch, K.O. (1991). Comparison of effects of Aroclors 1016 and 1260 on non-human primate catecholamine function. *Toxicology* 66, 145-163.
- Seegal, R.F., Bush, B., and Brosch, K.O. (1994). Decreases in dopamine concentrations in adult, non-human primate brain persist following removal from polychlorinated biphenyls. *Toxicology* 86, 71-87.
- Seegal, R.F., Okoniewski, R.J., Brosch, K.O., and Bemis, J.C. (2002). Polychlorinated biphenyls alter extraneuronal but not tissue dopamine concentrations in adult rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Environ Health Perspect* 110, 1113-1117.
- Sesack, S.R., Aoki, C., and Pickel, V.M. (1994). Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets. *J Neurosci* 14, 88-106.
- Shiman, R., Akino, M., and Kaufman, S. (1971). Solubilization and partial purification of tyrosine hydroxylase from bovine adrenal medulla. *J Biol Chem* 246, 1330-1340.
- Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K., and Uhler, M.D. (1999). Basic neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects, 6th edn (Lippincott Williams & Wilkins ).
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Tiberi, M., Jarvie, K.R., Silvia, C., Falardeau, P., Gingrich, J.A., Godinot, N., Bertrand, L., Yang-Feng, T.L., Freneau, R.T., Jr., and Caron, M.G. (1991). Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7491-7495.
- Tilson, H.A., Jacobson, J.L., and Rogan, W.J. (1990). Polychlorinated biphenyls and the developing nervous system: cross-species comparisons. *Neurotoxicol Teratol* 12, 239-248.
- Torres, G.E., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2003). Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci* 4, 13-25.
- Ungerstedt, U. (1976). 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine pathway: the turning syndrome. *Pharmacol Ther* 2, 37-40.
- von Euler, G. (1991). Biochemical characterization of the intramembrane interaction between neurotensin and dopamine D2 receptors in the rat brain. *Brain Res* 561, 93-98.
- Weiner, D.M., Levey, A.I., Sunahara, R.K., Niznik, H.B., O'Dowd, B.F., Seeman, P., and Brann, M.R. (1991). D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1859-1863.
- Xu, C., Coffey, L.L., and Reith, M.E. (1995). Translocation of dopamine and binding of 2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-fluorophenyl) tropane (WIN 35,428) measured under identical conditions in rat striatal synaptosomal preparations. Inhibition by various blockers. *Biochem Pharmacol* 49, 339-350.



---

Yung, K.K., Bolam, J.P., Smith, A.D., Hersch, S.M., Ciliax, B.J., and Levey, A.I. (1995). Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience* 65, 709-730.

## APPENDIKS

### I. Bufferløsninger

Løsning	Oppskrift
<b>19 mM natriumfosfat vaskeløsning (pH 7.4)</b>	Løs 2.22 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ i litt under 1 L destillert vann. Løs 3.44 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ i litt under 1 L destillert vann.  Bland de to løsningene og tilsett: NaCl        14.6 g KCl        0.75 g  Løs saltene og juster pH med NaOH. Tilsett $\text{dH}_2\text{O}$ til 2 L.
<b>19 mM natriumfosfat inkuberingsbuffer (pH 7.4)</b>	Løs 5,48 g sukrose i 50 mL 19 mM natriumfosfat skyllebuffer.

Løsning	Oppskrift
<b>50 mM Tris-base buffer (pH 7.4)</b>	Tris(hydroksymetyl)aminometan    12.1 g $\text{dH}_2\text{O}$ ad 2.0 L  Løs Tris-base i 1.8 L $\text{dH}_2\text{O}$ . Juster pH med HCl og tilsett $\text{dH}_2\text{O}$ til 2 L.
<b>50 mM Tris-base inkuberingsbuffer (pH 7.4)</b>	Tris(hydroksymetyl)aminometan    12.1 g NaCl                                        14.0 g KCl                                        0.75 g $\text{CaCl}_2$ 0.59 g $\text{Mg Cl}_2$ 0.19 g $\text{dH}_2\text{O}$ ad 2.0 L  Løs saltene i 1.8 L $\text{dH}_2\text{O}$ . Juster pH med HCl og tilsett $\text{dH}_2\text{O}$ til 2 L.

## II. Pipetteringsskjema

Alle volum er oppgitt i µl.	Tris- buffer	Homogenat	[ <sup>3</sup> H]SCH 23390	Ketanserin	SCH 23390
<b>Total Binding</b>	152	20	20	8	
<b>Uspesifikk binding</b>	144	20	20	8	8

### Pipetteringsskjema for [<sup>3</sup>H]SCH 23390-binding i striatum

Pipettering ble gjort fra: 0.02 µM [<sup>3</sup>H]SCH 23390, 2.5 µM ketanserin og 25 µM SCH 23390

Alle volum er oppgitt i µl.	Tris- buffer	Homogenat	[ <sup>3</sup> H]SCH 23390	Ketanserin	SCH 23390
<b>Total Binding</b>	152	30	10	8	
<b>Uspesifikk binding</b>	144	30	10	8	8

### Pipetteringsskjema for [<sup>3</sup>H]SCH 23390-binding til Hippocampus

Pipettering ble gjort fra: 0.02 µM [<sup>3</sup>H]SCH 23390, 2.5 µM ketanserin og 25 µM SCH 23390

Alle volum er oppgitt i µl.	Natrium fosfat- buffer	Synaptosom suspensjon	[ <sup>3</sup> H]- WIN 35,428	Nomifensin	PCB	DMSO
<b>Total binding</b>	170	20	10			
<b>Uspesifikk binding</b>	160	20	10	10		
<b>PCB prøve</b>	168	20	10		2	
<b>Kontroll uten PCB</b>	168	20	10			2

### Pipetteringsskjema for [<sup>3</sup>H]WIN 35,428-binding i cerebrum og striatum

Pipettering ble gjort fra: 0.1 µM [<sup>3</sup>H]WIN 35,428 og 0.2 mM nomifensin

---